THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jeanne CATTANEO
Licenciée ès-Sciences — Ingénieur-Chimiste E.N.S.C.T.

PREMIÈRE THÈSE

Purification et propriétés de la β aspartique-décarboxylase

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le Octobre 1962 devant la Commission d'examen:

MM. P. DESNUELLE — Président.

R. MERIGOUX, R. MONIER — Examinateurs.

J. C. SENEZ — Membre invité

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jeanne CATTANEO

Licenciée ès-Sciences — Ingénieur-Chimiste E.N.S.C.T.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

PREMIÈRE THÈSE

Purification et propriétés de la β aspartique-décarboxylase

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le Octobre 1962 devant la Commission d'examen:

MM. P. DESNUELLE		Président.
R. MERIGOUX R. MONIER	}	Examinateurs.
J. C. SENEZ		Membre invité

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au Champ d'Honneur, M. F. MARTY
Maître de conférences de Mathématiques
(14 juin 1940)

Doyens honoraires : MM. MARCHAUD, TRAYNARD, CORROY, CHOUX.

Professeurs honoraires : MM. J. MARCHAUD, E. TRAYNARD, J. PERES, G. PETIT, R. THIRY, J. BOSLER, A. TIAN, L. MARGAILLAN, P. BENOIT, H. CABANNES, P. CHOUX.

Doyen : M. P. R O U A R D — Assesseur : M.A. GUILLEMONAT

Secrétaire principal : M. C. MOYNAULT.

P R O F E S S E U R S

MM.	G. CORROY	Géologie et minéralogie
	R. CERICHELLI	Agronomie tropicale
	J. VALENSI	Mécanique expérimentale des fluides
	P. ROUARD	Physique générale
	H. PRAT	Botanique
	P. DESNUELLE	Chimie biologique
	M. ABELOOS	Biologie générale
	R. MERIGOUX	Physique industrielle
	P. VINCENSINI	Calcul différentiel et intégral
	E. CALVET	Chimie générale
	C. FEHRENBACH	Astronomie
	A. FAVRE	Mécanique de l'atmosphère
	A. GUILLEMONAT	Chimie industrielle
	J. M. PERES	Océanographie biologique
	G. CARPENI	Chimie M.P.C.
	C. JAUSSERAN	Physique M.P.C.
	R. MOLINIER	Biologie végétale

MM.	Y. DOUCET	Physique M.P.C.
	J.M. SOURIAU	Méthodes mathématiques de la physique
	P. COTTON	Electronique
	J. METZGER	Chimie S.P.C.N.
	J. TIMON-DAVID	Zoologie
	L. FOURES	Mathématiques
	D. MALE	Physique
	G. BODIOU	Mathématiques appliquées
	M. NAUDET	Chimie des corps gras
	F. NAHON	Techniques mathématiques de la physique
	J. PAILLARD	Psycho-physiologie
	L. SAVIDAN	Chimie systématique
	D. KASTLER	Physique théorique
	P. BOUSQUET	Physique S.P.C.N.
	P. PESTEIL	Physique P.C.B.
	G. LIANDRAT	Physique (Institut de Nice)
	P. CASAL	Mécanique rationnelle et appliquée
	L. ROYER	Minéralogie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	C. GOUVERNET	Géologie appliquée
	C. CLARION (Mlle)	Mécanique des fluides
	R. AMAR	Biologie animale P.C.B.
	A. JULG	Chimie théorique
	S. WACHS	Mathématiques générales (Institut de Nice)
	J. CHOUTEAU	Physiologie animale
	A. VISCONTI	Physique théorique
	J. LEFEBVRE	Chimie M.P.C.
	L. DEVEZE	Biologie marine
	S. TAXY (Mme)	Géologie historique
	A. BLANCHARD	Mathématiques générales
	P. BOUGHON	Mathématiques M.P.C.

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	M. L. FURNESTIN (Mme)	Biologie animale
	M. BERTRAND	Chimie S.P.C.N.
	J. TROMPETTE	Physique S.P.C.N.
	R. MONIER	Chimie biologique
	M. LAFFITTE	Chimie M.P.C.
	L. SIDERIADES	Dynamique des vibrations
	J. MANDELBROJT	Physique nucléaire
	F. BOREL	Mathématiques
	M. DUSSARDIER	Physiologie animale
	J. BLANC	Géologie marine
	R. CHANDEBOIS (Mlle)	Biologie animale
	A. BOURDILLON	Biologie animale
	A. ARAGNOL	Mathématiques
	B. GOUZON	Chimie
	R. PHILIP	Physique
	M. BIZOUARD	Physique

MM.	H. GUENOCHE	Mathématiques appliquées
	C. YTHIER	Chimie (Nice)
	S. BAUDOIN (Mme)	Mathématiques (Nice)
	J. RICARD	Botanique
	H. MOREL	Mathématiques

CHARGES DE CONFERENCES

MM.	J. MORIN	Neurophysiologie
	H. GAVINI (Mlle)	Psycho-physiologie
	P. JEAN	Physique
	J. SENEZ	Chimie biologique
	M. COTTON (Mme)	Mathématiques
	H. GASTAUD	Neurophysiologie
	A. BEZAGUET	Chimie
	S. GUEIRARD (Mlle)	Pétrographie
	L. COHEN-SOLAL	Physique (Nice)
	Roger MOLLINIER	Biologie végétale
	D. SCHACHTER (Mme)	Ecologie terrestre et limnique
	L. GAFFIER	Botanique
	L. LAGARDE (Mlle)	Chimie générale
	F. CATZIGRAS (Mlle)	Géologie

A MA FAMILLE

En témoignage d'affection

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547003_0046

A Monsieur Jacques C. SENEZ

Directeur du Laboratoire de Chimie Bactérienne du C.N.R.S., qui m'a dirigée et encouragée dans la réalisation de ce travail, en témoignage de ma profonde gratitude

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur le Professeur Desnuelle qui a bien voulu juger cette Thèse. Je remercie également Messieurs les Professeurs Merigoux et Monier d'avoir accepté de faire partie de mon Jury.

Mes remerciements vont tout particulièrement à Madame P. Beaumont pour la collaboration efficace qu'elle m'a apportée dans ce travail.

INTRODUCTION

Dès mon entrée au Laboratoire de Chimie Bactérienne du C.R.S.I.M., en 1954, je me suis intéressée au métabolisme des amino-acides chez les bactéries sulfato-réductrices.

Ces organismes, découverts par Beijerinck en 1895 et auxquels est actuellement donnée la dénomination spécifique de Desulfovibrio desulfuricans, sont anaérobies stricts et ont la particularité d'oxyder l'hydrogène moléculaire et un petit nombre de composés organiques (lactate, pyruvate et acides dicarboxyliques en C_4) en utilisant, comme accepteur d'électrons, le sulfate qui est réduit en hydrogène sulfuré.

Il avait été antérieurement constaté au Laboratoire, que la plupart des souches typiques de D. desulfuricans ont, à l'égard des amino-acides, un comportement remarquablement simple. Elles sont dépourvues d'amino-acides décarboxylases et désaminases, mais possèdent cependant des transaminases actives (109) et un système cystéine-désulfhydrase (110).

Reprenant ces études avec d'autres souches du même organisme, nous avons constaté que l'une d'entre elles, la souche El Agheila Z, isolée par Butlin et Postgate, présente des particularités intéressantes. Cette souche est d'autre part caractérisée par son activité hydrogénasique et sa teneur en cytochrome c_3 très faibles (111) ainsi que par son aptitude à décarboxyler le pyruvate en l'absence de sulfate, suivant un processus conduisant à la formation simultanée de CO_2, d'acétate et d'éthanol (110).

En ce qui concerne le métabolisme des amino-acides, nos expériences préliminaires ont montré que la souche El Agheila Z, possède non seulement des transaminases, mais encore une glutamique et une aspartique décarboxylases. Ce dernier enzyme présente la propriété de convertir l'acide aspartique en α-alanine par une décarboxylation portant non pas sur la fonction carboxylique en C_1, voisine de la fonction α-aminée, mais sur le carboxyle situé à l'extrémité de la chaîne carbonée, en position 4. Cette particularité remarquable nous a incités à étudier de

façon détaillée cet enzyme qui avait été découvert chez d'autres organismes, sans avoir cependant été purifié et séparé d'autres décarboxylases à phosphate de pyridoxal.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à un exposé bibliographique sur les décarboxylases et leur mode d'action. Après la description des principales techniques employées au cours de ce travail, le troisième chapitre décrit les propriétés comparées des décarboxylases de l'acide aspartique et de l'acide glutamique. Des essais de purification de l'aspartique-décarboxylase sur gel de brushite constituent la quatrième partie. Ils nous ont permis de séparer la transaminase et la décarboxylase de l'acide aspartique et de démontrer que la formation d'α alanine à partir d'acide aspartique est bien liée à un processus de décarboxylation directe. L'activation par les céto-acides de l'enzyme nous a conduits, dans le cinquième chapitre, à l'étude de transaminations chimiques se produisant entre les dérivés aminés et aldéhydiques de la vitamine B_6. Enfin dans une dernière partie, des essais de chromatographie sur carboxy-méthyl-cellulose nous ont permis d'obtenir l'enzyme dans un assez grand état de pureté et de montrer que cette décarboxylase est bien un enzyme à pyridoxal-phosphate.

CHAPITRE I

EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

La production biologique d'amines au cours de la putréfaction des protéines a été observée dès la fin du XIXe siècle. Entre 1900 et 1924 Hanke et Koessler (50) ainsi que d'autres auteurs (1,8,33) ont étudié la conversion des amino-acides en amines en employant des souches pures de bactéries. Mais ces travaux n'apportaient aucun éclaircissement sur le mécanisme de cette transformation et c'est seulement en 1940 que Gale et ses collaborateurs (38-41) ont montré que la formation d'amines est due à l'action d'enzymes spécifiques, catalysant la décarboxylation des amino-acides. Le produit de la réaction est, dans le cas des amino-acides monocarboxyliques, l'amine correspondante :

$$R - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH \longrightarrow R - CH_2 - NH_2 + CO_2$$

ou encore, comme on le verra plus loin, un nouvel acide aminé, lorsque le substrat est un amino-acide dicarboxylique.

Les amino-acides décarboxylases sont présentes dans les tissus animaux et végétaux, mais elles ne semblent pas jouer un rôle très important dans le métabolisme des acides aminés chez les organismes supérieurs. Par contre, chez les microorganismes, ces enzymes sont très largement distribués et constituent un élément important du métabolisme de l'azote organique.

I.- DECARBOXYLASES DES MAMMIFERES ET DES VEGETAUX

En 1936, Werle (132) a établi pour la première fois l'existence d'une décarboxylase chez les mammifères en montrant que les cellules rénales transforment l'histidine en histamine.

Par la suite, Blaschko et divers autres auteurs ont montré la présence de décarboxylases dans certains tissus de mammifères. C'est ainsi que le foie et le rein décarboxylent la 3,4 dihydroxyphénylalanine (DOPA) (61), la 3,4 dihydroxyphénylsérine (56), l'acide cystéique (15) et l'acide cystéine-sulfinique (62).

La 5 hydroxytryptophane, produit d'oxydation du L-tryptophane, est décarboxylé en 5 hydroxytryptamine ou sérotonine (123,124) et la présence d'acide γ-amino-butyrique dans les tissus du cerveau a conduit à la découverte de la glutamique-décarboxylase en 1950 (134,103,104).

Cette dernière décarboxylase est la seule qui ait été trouvée dans les tissus végétaux (105,106).

Bien que, comme nous l'avons dit précédemment, le rôle de ces enzymes dans le métabolisme des acides aminés paraisse secondaire, certaines amines résultant de leur action jouent un rôle physiologique important. C'est ainsi, notamment, que la sérotonine et l'histamine, cette dernière provenant de l'histidine, sont des substances vaso-pressives et que la 3,4 dihydroxyphényléthylamine, produit de décarboxylation de la DOPA, est le précurseur de l'adrénaline. La fonction physiologique de l'acide γ-amino-butyrique provenant de l'acide glutamique et présent en assez grande quantité dans le tissu cérébral n'est pas élucidée. Il est possible que cette substance transamine avec l'α-céto-glutarate pour donner la semi-aldéhyde succinique, laquelle, par oxydation en acide succinique, entrerait dans le cycle tricarboxylique de Krebs.

II.- DECARBOXYLASES BACTERIENNES

a) Nature des acides aminés décarboxylés.

En 1940, Gale et ses collaborateurs ont mis en évidence chez de nombreux microorganismes (*E. coli*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Protéus*) (39-41,43,44,35,121) diverses amino-

acides décarboxylases actives à l'égard de la L (+) lysine, la L (+) arginine, la L (-) tyrosine, la L (-) histidine et l'acide L (+) glutamique.

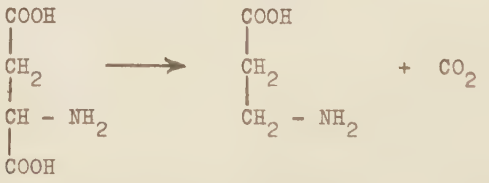
Comme les acides monoamino-monocarboxyliques n'étaient pas décarboxylés par les organismes étudiés, ces expériences semblaient indiquer que les amino-acides servant de substrat doivent posséder à la fois la configuration L et un groupe polaire non substitué autre que le groupement α-carboxyle et la fonction α-aminée.

Depuis ces importants travaux, King, Ekladius et Sutton (70,32) ont cependant mis en évidence dans les cellules de Proteus vulgaris des décarboxylases agissant sur les acides aminés neutres comme la valine et la leucine, et on a également observé la décarboxylation de l'acide para-aminobenzoïque par des préparations d'Escherichia coli (84).

Chez de nombreux organismes, comprenant E. coli, Aerobacter aerogenes et Sarcina lutea, E. Work et ses collaborateurs ont découvert un enzyme qui décarboxyle l'acide mésodiamino-pimélique (28-30,60), et qui constitue une intéressante exception par sa propriété d'agir sur l'extrémité de la molécule possédant la configuration D.

Parmi tous les acides aminés servant de substrat aux décarboxylases, l'acide aspartique tient une place à part. En effet, cet acide peut être dégradé de deux manières différentes par les bactéries suivant que le carboxyle attaqué est le groupement α ou le groupement β.

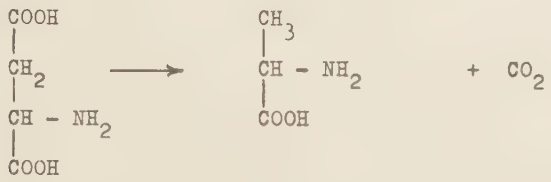
Virtanen et ses collaborateurs (126,127) ont montré que Rhizobium leguminosarum transforme l'acide aspartique en β alanine suivant la réaction :



acide aspartique β-alanine

Cet enzyme a été retrouvé chez d'autres microorganismes mais son activité est si faible qu'il n'a pas été possible de mesurer le dégagement de gaz carbonique par les méthodes manométriques, et que la formation de β-ala-

nine n'a été détectée que par des essais microbiologiques. L'autre mode de dégradation de l'acide aspartique est celui que nous avons étudié dans le présent travail. Il consiste dans un type très particulier de décarboxylation, portant sur le groupement β-carboxyle de l'acide aspartique et transformant celui-ci en α-alanine suivant le schéma :



acide aspartique α-alanine

Cette β-décarboxylase a été découverte par Mardashev chez Mycobacterium n. sp. (77) en 1948 et retrouvée plus tard par Meister (87) chez un organisme anaérobie strict, Clostridium welchii, par nous chez Desulfovibrio desulfuricans (112), puis par Crawford (26) chez l'algue bleue Nocardia globerula et enfin par Bheemeswar (12) chez le ver à soie Bombyx mori.

Il résulte de ce bref exposé que, contrairement à ce que pensait Gale, il n'est pas indispensable pour qu'un amino-acide soit décarboxylé qu'il possède un groupement polaire autre que le carboxyle et la fonction α-aminée. La stéréospécificité pour la série naturelle L est relativement plus rigoureuse puisque la seule exception est celle de l'acide diaminopimélique, composé qui possède d'ailleurs à la fois la configuration L et la configuration D. Le nombre des décarboxylases varie beaucoup d'une espèce bactérienne à l'autre. C'est ainsi que les Streptocoques ne décarboxylent que la tyrosine tandis que certaines bactéries coliformes peuvent décarboxyler jusqu'à six amino-acides (38).

b) Conditions de formation des amino-acides décarboxylases bactériennes.

1.- Présence du substrat.

D'une manière générale, les amino-acides décarboxylases

sont des enzymes adaptatifs qui ne sont synthétisés que si la bactérie est cultivée en présence de substrat. Une exception apparente à cette règle est la glutamique-décarboxylase dont on a signalé que, chez les organismes capables de former cet enzyme, celui-ci est produit en faible quantité, même en l'absence de glutamate exogène (44). Cependant l'addition d'acide glutamique accroît fortement l'activité enzymatique des cellules, ce qui paraît indiquer qu'en milieu minimal, la biosynthèse de l'enzyme est induite par le glutamate endocellulaire.

Il est possible que la spécificité de l'induction ne soit pas rigoureuse. En effet, King et coll. (32) ont signalé que les cellules de P. vulgaris cultivées en présence de leucine, valine, norvaline, isoleucine ou acide γ-aminobutyrique décarboxylent l'ensemble de ces cinq amino-acides. Il n'est cependant pas établi si ces différents amino-acides sont décarboxylés chacun par un enzyme spécifique ou s'il s'agit d'une décarboxylase polyvalente. En d'autres termes, il reste à savoir si la non-spécificité concerne l'activité enzymatique ou l'induction.

2.- pH du milieu de culture.

Gale a montré que la plupart des amino-acides décarboxylases ne sont formées qu'en milieu fortement acide ($pH < 5$). Comme ces conditions sont généralement défavorables à la croissance bactérienne, il faut, pour obtenir des cellules très actives, recourir à des artifices. On peut soit acidifier les cultures en fin de croissance, soit employer des milieux glucosés non tamponnés où la production d'acides par les organismes eux-mêmes réalise des conditions analogues.

En milieu alcalin, ce sont, par contre, les amino-acides désaminases qui sont préférentiellement synthétisées par les organismes.

Ces observations paraissent indiquer que les enzymes agissant sur les amino-acides ne sont induits que dans les conditions où le groupement sur lequel ils agissent n'est pas ionisé.

Il existe néanmoins des exceptions à cette règle comme l'indique le fait que les décarboxylases agissant sur la leucine, la valine et l'acide aspartique sont produites préférentiellement à pH 7.

3.- Température.

La température optimum à laquelle s'effectue la formation

des décarboxylases varie avec l'organisme étudié : en effet, chez E. coli cette température optimum est 20 - 26°, la formation des enzymes étant inhibée lorsque la croissance a lieu à 37°. Pour S. faecalis ou C. welchii au contraire, la teneur en décarboxylases des cellules est plus élevée à 37° qu'à 25° (39,40).

4.- Age des cellules.

Les décarboxylases ne sont formées en quantité importante qu'à la fin de la phase exponentielle de croissance (39,40) ce qui paraît indiquer que leur rôle physiologique n'est pas très important pendant la phase anabolique. Sur ce point encore, les décarboxylases de la leucine et de la valine font exception en étant formées préférentiellement pendant la phase logarithmique de la croissance.

c) Conditions d'activité.

1.- Spécificité du substrat.

On a déjà vu, à propos de la biosynthèse des décarboxylases, qu'à un petit nombre d'exceptions près, l'activité de ces enzymes est spécifique pour la configuration L et pour un seul amino-acide. Ces propriétés sont largement utilisées pour doser spécifiquement et quantitativement un L amino-acide dans les mélanges complexes résultant des hydrolyses de protéines (44) ou encore pour déceler de faibles proportions de composé L dans des préparations de D amino-acides.

En ce qui concerne la spécificité du substrat, la décarboxylation de la L tyrosine a conduit à des observations intéressantes. S. faecalis possède une L tyrosine-décarboxylase qui agit à la fois sur cet amino-acide, sur la DOPA et sur la L phénylalanine (85). Par contre, la DOPA décarboxylase (16) des mammifères est inactive à l'égard de la tyrosine et la phénylalanine. Dans le cas de ce dernier enzyme, l'activité est liée à la présence sur le substrat d'un hydroxyle en méta par rapport à la chaîne alanine, comme le démontre le fait que l'enzyme agit non seulement sur la DOPA mais encore sur la 3 (méta)-hydroxyphénylalanine.

2.- pH optimum d'activité.

Les décarboxylases bactériennes ont, en général, un pH optimum d'activité acide situé entre 2,5 et 6, contrairement à celles des mammifères qui ont un pH optimum neutre ou légèrement alcalin.

La décarboxylation à pH acide conduit à la formation d'une amine et au dégagement de CO_2, faisant ainsi varier le pH du milieu vers la neutralité. Cette observation a suggéré l'hypothèse qu'une des fonctions des décarboxylases des amino-acides serait d'élever le pH du milieu à une valeur convenable pour la croissance (50-54).

Les décarboxylases de la leucine et de la valine ont un pH optimum voisin de la neutralité et, par là, sont à rapprocher de l'enzyme qui agit sur l'acide diaminopimélique et dont l'activité est également maximum à pH neutre.

III. STRUCTURE MOLECULAIRE DES DECARBOXYLASES

a) Nature du coenzyme.

Par précipitation de la lysine-décarboxylase avec le sulfate d'ammonium à pH alcalin, Gale et ses collaborateurs ont obtenu une protéine inactive envers la lysine mais qui pouvait être réactivée par addition de préparations bouillies de l'extrait brut actif, de bactéries ou de levure (121). Ces auteurs ont réussi à dissocier de la même façon l'apoenzyme du coenzyme des décarboxylases de la tyrosine, arginine et ornithine. Avec les préparations d'apoenzyme obtenues, ils ont pu déterminer d'une manière comparative le contenu en cofacteur de différents tissus et cellules.

Des études sur la nutrition de certaines bactéries lactiques ont conduit progressivement à l'identification de ce cofacteur avec un dérivé de la vitamine B_6.

En 1942, Snell et coll. (115) ont observé que l'urine des animaux ayant absorbé du pyridoxol * contenait des produits de métabolisme

---

* Conformément aux recommandations récentes de la Commission de terminologie chimique de l'Union Internationale de Chimie pure et appliquée, le terme de pyridoxol est utilisé dans cette thèse pour désigner la forme carbinol de la vitamine B_6, et le terme de "pyridoxine" pour désigner l'ensemble des composés appartenant au groupe des vitamines B_6.

de ce corps plusieurs milliers de fois plus actifs que le pyridoxol lui-même comme facteur de croissance pour les bactéries de l'acide lactique. Ces produits appelés "pseudopyridoxines" ont été identifiés en 1944 avec un mélange de deux dérivés du pyridoxol (114), le pyridoxal produit d'oxydation et la pyridoxamine, produit d'amination. Par la suite, on a montré que ces deux dérivés constituent la majeure partie de la forme sous laquelle se trouve la vitamine B_6 dans les organismes.

La même année, en 1944, Bellamy et Gunsalus (46) ont observé que les cellules de S. faecalis cultivées dans un milieu sans pyridoxol, sont incapables de décarboxyler la tyrosine et que l'addition de pyridoxal active les suspensions de cellules. Ils ont constaté d'autre part que, dans le cas des préparations séchées (47), il est nécessaire d'ajouter à la fois du pyridoxal et de l'adénosine-triphosphate pour que la décarboxylation se produise.

Cette observation a conduit à l'identification rapide du coenzyme avec un dérivé phosphorylé du pyridoxal.

La position du groupement phosphate dans la molécule de pyridoxal n'a été définitivement établie qu'en 1952, par Baddiley et Mathias (5) qui ont effectué la synthèse chimique du pyridoxal-5-phosphate. Une cinquième forme naturelle de la vitamine B_6, facteur de croissance très actif pour de nombreuses bactéries lactiques, le pyridoxamine-phosphate a été découverte par Rabinowitz et Snell en 1947 (101).

La figure 1 montre les formules des cinq dérivés de la vitamine B_6 trouvés dans les matériaux naturels.

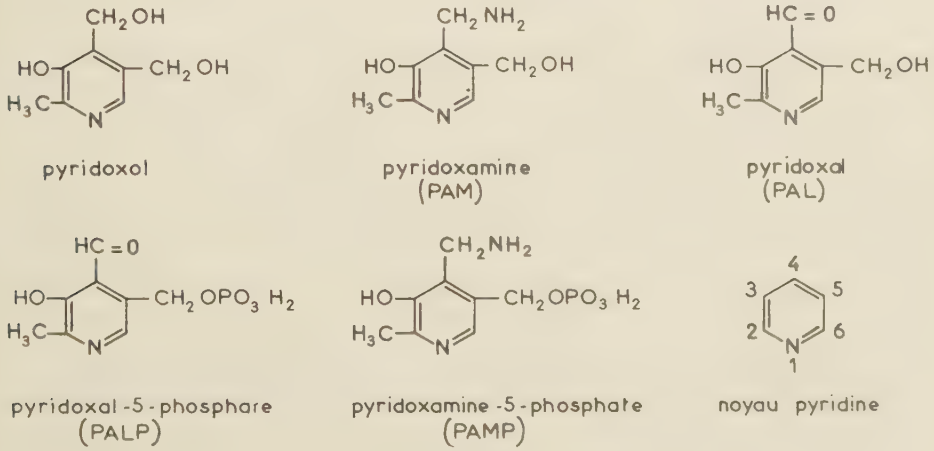


Figure 1

b) Formation de l'apoenzyme en l'absence de coenzyme.

Certaines bactéries lactiques sont auxotrophes à l'égard du pyridoxal-phosphate ou de ses dérivés. Si on étudie la croissance des streptocoques dans des milieux contenant des quantités croissantes de vitamine B_6, on peut distinguer trois types de culture (25) :

1) les cellules développées sur un milieu contenant un excès de vitamine possèdent des activités transaminases et décarboxylases maxima.
2) les cellules cultivées en milieu contenant une concentration de pyridoxol juste suffisante pour atteindre la croissance maximum ont la même activité transaminase mais une activité décarboxylase faible.
3) les cellules provenant de cultures en milieu déficient en pyridoxol n'ont aucune activité décarboxylase et une activité transaminase très faible.

Cependant l'addition de vitamine B_6 restaure les activités cellulaires à leurs valeurs maxima ce qui démontre que les cellules de Streptocoques cultivées dans des milieux déficients en vitamine B_6 synthétisent normalement les apo-décarboxylases et apo-transaminases, mais qu'en l'absence du cofacteur, ces enzymes demeurent inactifs. Ces observations montrent en outre que les quantités de vitamine B_6 nécessaires pour activer les apoenzymes varient avec la nature de ces derniers.

c) Résolution apoenzyme-coenzyme.

On a déjà vu que les décarboxylases de la lysine, arginine, tyrosine et ornithine se dissocient facilement à pH alcalin en apoenzyme et coenzyme. Cette résolution n'est pas toujours aussi facile. C'est ainsi que l'histidine et la glutamique-décarboxylases n'ont pas pu être résolues par les méthodes habituelles de précipitation et, pour cette raison, ont été longtemps considérées comme des enzymes n'ayant pas de cofacteur.

Shukuya et Schwert ont obtenu récemment (113) la glutamique-décarboxylase d'E. coli dans un grand état de pureté et ont montré qu'elle était activée par le PALP. L'enzyme garde la plus grande partie de son activité après deux passages sur colonne échangeuse d'ions, ce qui montre que la liaison apoenzyme-coenzyme est très forte. Le poids

moléculaire de cette décarboxylase est de 300 000.

IV. MODE D'ACTION DES ENZYMES A PALP.

a) Etude des propriétés chimiques du pyridoxal et de son phosphate en relation avec leurs activités catalytiques.

1.- Formes d'équilibre de la vitamine B_6 en solution aqueuse.

La figure 2 montre les différentes formes ioniques du pyridoxol en solution aqueuse. Ces formes sont celles du cation Ia en milieu acide, de l'anion Ic en milieu alcalin, et des zwitterions I et Ib en milieu neutre (55,58,92).

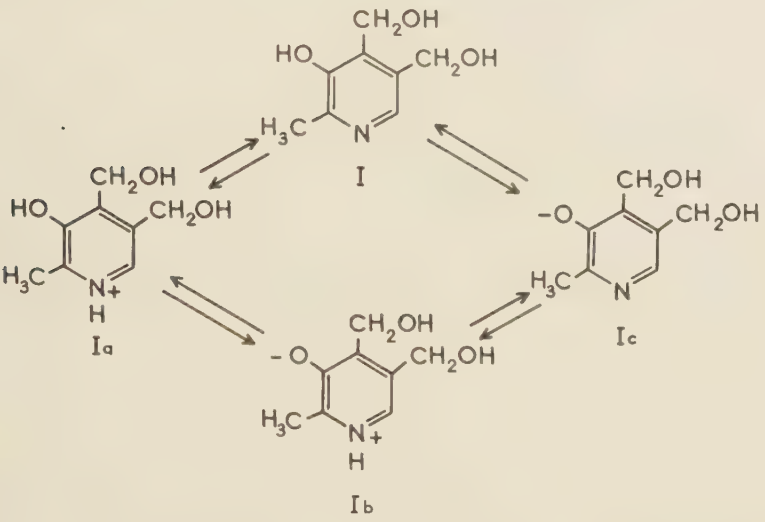


Figure 2

Dans le cas du pyridoxal, la possibilité de formation d'hémiacétal et de composés d'hydratation (92) conduit à des formes ioniques additionnelles (Fig. 3).

Le rapport des formes hémiacétal aux formes aldéhyde libre du pyridoxal est approximativement de 80 : 1 à la neutralité et seulement de 2,8 : 1 à pH 10,0.

Dans le 5-désoxypyridoxal, c'est-à-dire dans le dérivé du pyridoxal où la fonction 5-hydroxyméthyle est remplacée par un groupement méthyle, comme dans le pyridoxal-phosphate d'ailleurs, la formation d'hémiacétal interne n'est pas possible et c'est pourquoi à pH neutre, les solutions de ces composés contiennent de plus grandes concentrations d'aldéhyde libre que les solutions équimoléculaires de pyridoxal (92).

Le groupement aldéhyde libre étant celui qui participe à la catalyse, on comprend la nécessité de la présence d'un groupement phosphate en position 5.

2.- Formation d'imines entre le PAL ou son phosphate et les amino-acides ou les amines.

Les amines ou les amino-acides forment avec le groupe aldéhyde du pyridoxal ou du pyridoxal-phosphate des bases de Schiff ou imines qui ont été étudiées par Metzler et Snell (91,93) pour le PAL et par Blakley et Matsuo pour le PALP (14,79).

Ces réactions se traduisent par un jaunissement de la solution, c'est-à-dire un accroissement de l'absorption dans la région de 345 à 430 mμ, la position exacte du maximum dépendant du pH et de l'amine employée.

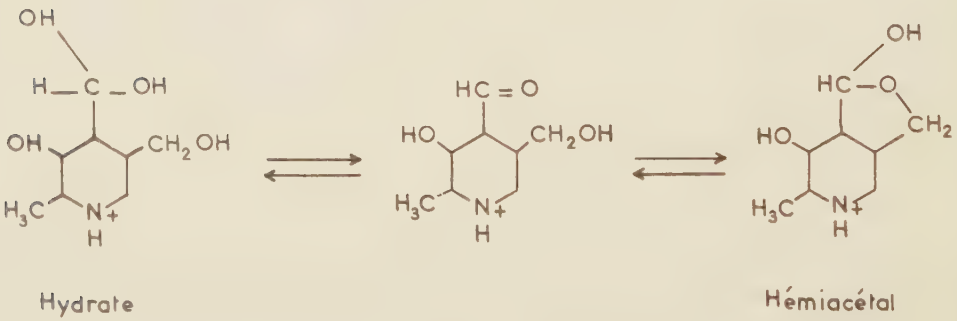


Figure 3

La formation d'imines est favorisée dans les solvants non polaires tels que l'alcool d'où on les a isolées facilement (57,59,135,21).

En solution dans l'eau, les bases de Schiff sont instables et tendent à s'hydrolyser partiellement.

Metzler en 1957 (93) a étudié la position d'équilibre des imines du pyridoxal en solution aqueuse. Cet auteur a constaté que la formation d'imine est plus importante avec le PALP qu'avec le PAL, ce qui est dû exclusivement aux plus hautes concentrations d'aldéhyde libre présentes dans les solutions de PALP. Il a d'autre part étudié la structure de ces composés et ses observations l'ont conduit à penser qu'il existe une liaison hydrogène entre l'azote de l'acide aminé et le groupe hydroxyphénolique et qu'à pH voisin de la neutralité deux formes tautomères ayant un maximum d'absorption à 414 mμ, sont en équilibre (Fig. 4). L'addition d'alcali entraine une ionisation (Fig 4, III).

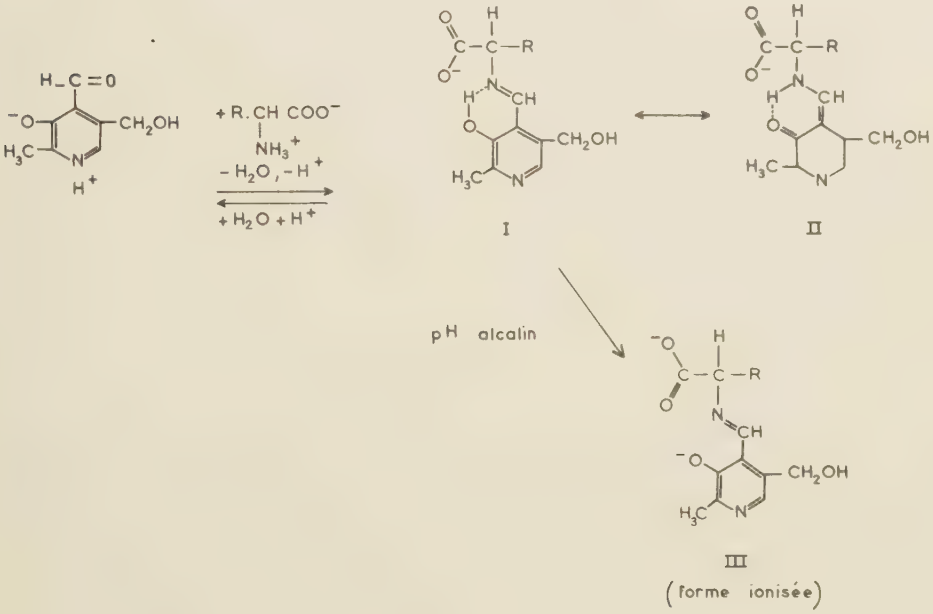


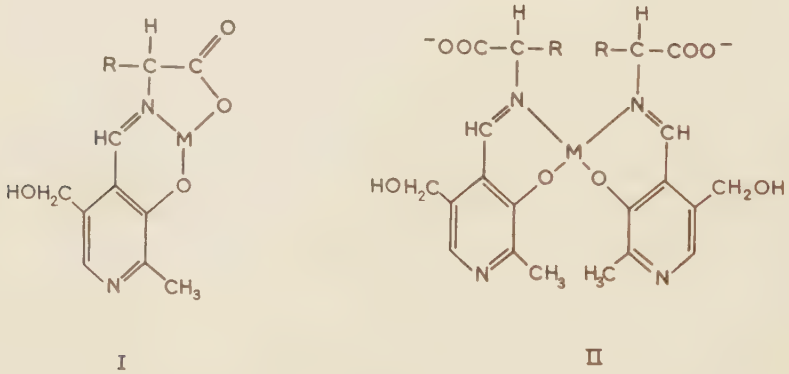
Figure 4

3.- Réaction du pyridoxal et de ses imines avec les ions métalliques. Formation de complexes.

Metzler et Snell en 1952 (91) ont observé que certains métaux catalysent les transaminations non-enzymatiques entre PAL ou PALP et amino-acides en solution aqueuse. Cette catalyse par les ions métalliques a été expliquée par la formation de complexes intermédiaires semblables à ceux que forment la salicylaldéhyde avec les ions métalliques et les amines (78).

Plusieurs complexes du pyridoxal et des amino-acides avec le Cu^{++}, le Fe^{+++}, Al^{+++}, Mn^{++}, Zn^{++} ou Mg^{++} comme ions métalliques ont été isolés soit à partir de solutions alcooliques (6,94), soit à partir de solutions aqueuses (94).

Plusieurs structures sont possibles, notamment celles représentées sur la figure 5.



I II

Figure 5

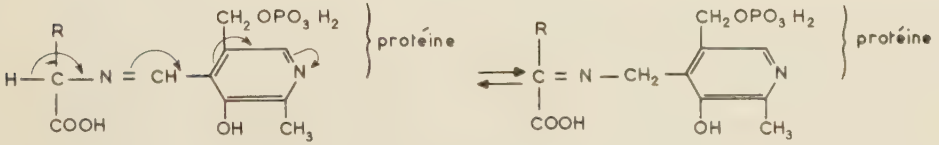
Eichorn et Dawes en 1954 (31) ont montré, par des méthodes spectrophotométriques, la formation de complexes du type II dans lesquels l'alanine, le PAL et le Ni^{++}, ou le pyruvate, le PAM et le métal sont respectivement dans les proportions 2 : 2 : 1. Fasella et coll. en 1957 (37) ont réussi à isoler par chromatographie et électrophorèse sur papier les complexes alanine-PAL-AL^{+++} et pyruvate-PAM-AL^{+++} qui sont aussi du type II et dont les constituants sont dans les mêmes proportions. Des études de Christensen (22) sur les complexes cristallisés ont montré que dans

le cas du cuivre, le complexe obtenu ne comporte qu'une molécule d'amino acide, une molécule de PAL et un atome de cuivre. Par contre, avec d'autres métaux, un atome de métal peut être coordonné soit avec 2 molécules d'amino-acide et 1 molécule de PAL, soit avec deux amino-acides et 2 PAL.

Christensen a précisé, en outre, que dans les complexes formés avec le Mn^{++} et le Ni^{++}, il n'existe pas de liaison entre l'oxygène phénolique et le métal. Les spectres infra-rouges ont montré, en effet, une structure neutre pour les complexes du cuivre et une structure zwittérion pour le Mn et le Ni. En 1956, Longenecker et Snell (73) ont montré que ces complexes servent d'intermédiaires dans les transaminations non-enzymatiques.

b) Mécanisme général des réactions catalysées par les enzymes à PALP.

Une théorie générale des réactions catalysées par les enzymes à pyridoxal-phosphate a été indépendamment développée par Braunstein et Shemyakin (17) en 1953 et par Metzler et Snell (95) en 1954 ; d'après cette théorie, les réactions catalysées par les enzymes à PALP sont rendues possibles grâce aux propriétés particulières des bases de Schiff de type I (fig. 6) formées par condensation des amino-acides avec le groupement aldéhyde du pyridoxal, et des bases tautomères de type II.



I II

Figure 6

Le système plan de double liaisons conjuguées permet, en effet, le déplacement d'une paire d'électrons d'une des liaisons de l'atome de carbone α de l'amino-acide vers l'azote de l'imine et l'azote du noyau pyridine. La densité électronique du carbone α est fortement diminuée et il en résulte un affaiblissement des liaisons entre ce carbone et ses substituants. Dans certaines conditions, c'est-à-dire dans le cas de certains substrats et de certains apoenzymes, les liaisons des atomes de carbone β et γ sont également affaiblies et mobilisées.

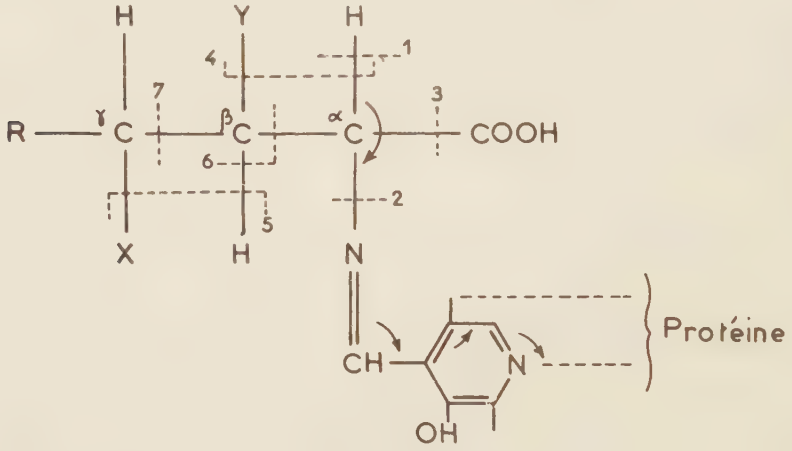


Schéma de Braunstein

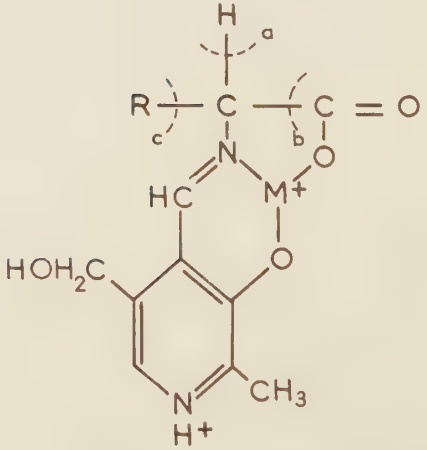


Schéma de Snell

Figure 7.- Activation des liaisons chimiques dans les molécules d'acides aminés.

Les schémas de Braunstein et de Snell (Fig.7) montrant le mode d'activation des liaisons chimiques dans les amino-acides par les enzymes à pyridoxal sont équivalents, à ceci près que, Snell et coll. soulignent le rôle de la chélation des bases de Schiff avec un métal et considèrent que ce rôle est très important pour intensifier le déplacement électronique par attraction vers l'ion métallique, fortement électronégatif.

Plusieurs des transformations des amino-acides peuvent se produire non-enzymatiquement lorsque ceux-ci réagissent avec le PAL, surtout en présence de certains métaux. Snell et son groupe (65,95) ont étudié entre 1952 et 1957 plusieurs systèmes de ce type et ont pu déterminer ainsi les groupements essentiels pour l'activité catalytique dans la molécule de PAL. D'après ces auteurs, le rôle des ions métalliques consiste à favoriser la formation de complexes intermédiaires, à maintenir le système de double liaisons conjuguées dans la configuration plane nécessaire pour le déplacement d'électrons et enfin à fournir un groupement électrophile additionnel, en plus de l'atome d'azote hétérocyclique. Ceci est certainement exact en ce qui concerne les réactions modèles, non-enzymatiques, mais il semble que, dans le plupart des réactions catalysées par les enzymes à PALP, ces mêmes fonctions soient assurées par l'apoenzyme.

Les schémas de Braunstein et de Snell (fig. 7) conduisent à une classification rationnelle des enzymes à PALP, suivant que les électrons déplacés proviennent du carbone α de l'amino-acide ou des carbones voisins (Tableau I). On voit d'après ce tableau que le pyridoxal-phosphate intervient principalement dans les réactions du métabolisme des acides aminés. Cependant, en 1957, Baranowski et coll. (7) ont montré que ce cofacteur joue aussi un rôle dans la phosphorylation du glycogène par les extraits du muscle. C'est par l'intermédiaire du groupement aldéhydique que s'effectue la combinaison du PALP avec l'apoprotéine de la phosphorylase. Celle-ci comporte la formation d'une base de Schiff avec le groupement ε-aminé d'un résidu lysine. Le PALP maintient la phosphorylase sous sa forme tétramère active mais le rôle exact de ce cofacteur à l'égard de l'enzyme n'est pas encore complètement élucidé.

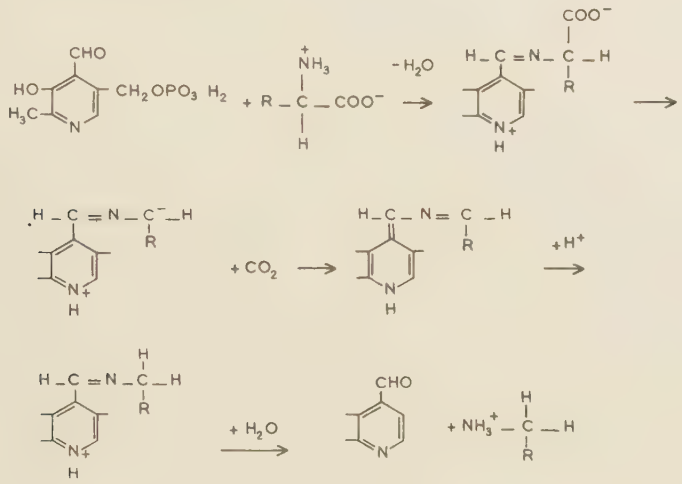
Tableau I : Classification des enzymes à pyridoxalphosphate.

Liaisons rompues	Types de Réaction	Enzyme
1. Elimination et remplacement des substituants sur l'atome de carbone α		
α-C—H (1) x	Dissociation de l'hydrogène-α	Aminophérases ; racémases et autres enzymes à PPal
	Racémisation des α-aminoacides	Racémases
	Condensation de glycine	Sérine et thréonine desmolases ; γ-aminolévulinate synthase
α-C—N et α-C—N (2)	Transamination	Aminophérases
	Désamination oxydative	Diamine oxydase
α-C—COOH (3)	α-Décarboxylation	Aminoacides α-décarboxylases
α-C—β-C (et β-C-H)(6)	Rupture α,β des β-hydroxy aminoacides	Sérine et thréonine desmolases
2. Elimination et remplacement des substituants sur l'atome de carbone-β.		
β-C—Y et α-C—H (4)	Elimination du H-α et d'un substituant polaire sur le C-β.	Tryptophanase ; sérine et thréonine deshydrases ; β-thionases
	Remplacement d'un substituant polaire sur le C-β	Tryptophane synthase ; cystathionine synthase (I) sérine sulfhydrase.
β-C— γ-C (7)	β-Décarboxylation ; rupture hydrolytique des -céto-α-aminoacides	Aspartate β-décarboxylase kynuréninase
3. Elimination et remplacement des substituants sur le carbone-γ		
γ-C—X et β-C—H (5)	Elimination du H-β et d'un substituant polaire sur C-γ	Homosérine deshydrase, γ-thionase, homosérine isomérase (thréonine synthase)
	Remplacement d'un substituant polaire sur le γ-C	Cystathionine synthase (II).

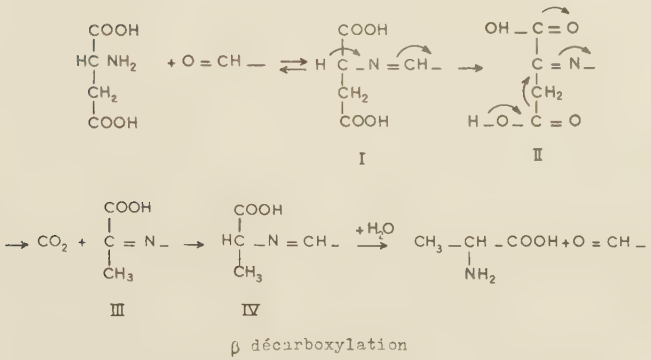
x Les chiffres entre parenthèses correspondent à ceux de la fig. 7.

Les décarboxylations qui nous intéressent plus particulièrement, correspondent à la rupture de la liaison αC-COOH dans le cas le plus fréquent, ou de la liaison βC- γC dans le cas de la β aspartique-décarboxylase:

L'α décarboxylation comprend la dissociation du groupement carboxyle rattaché au carbone α sans que soit dissocié l'atome d'hydrogène lié au même carbone. Dans ce procédé, il n'y a donc pas passage par l'imine tautomère II (Fig. 6). Les déplacements électroniques dans l'imine I conduisent directement à la rupture de la liaison αC-COOH. Un proton vient s'attacher au carbone formant une autre azométhine qui s'hydrolyse en donnant l'amine et l'aldéhyde du PALP. La suite de ces réactions est représentée sur la figure 8.



α décarboxylation



β décarboxylation

Figure 8.- Mécanismes de décarboxylation.

Mendeles et coll. (75) ont incubé dans D_2O une α décarboxylase et l'amine correspondante. Ils ont constaté un échange lent, stéréospécifique, d'un seul atome d'hydrogène sur le carbone aminé de l'amine, ce qui démontre qu'il n'y a pas dissociation d'un proton, puisqu'en ce dernier cas, les deux atomes d'hydrogène de l'amine auraient nécessairement été échangés.

La β-décarboxylation de l'acide aspartique (17) s'opère, au contraire, par conversion des deux formes tautomères de l'imine avec labilisation de l'atome d'hydrogène α, comme le montre schématiquement la figure 8.

Les bases de Schiff du type II (Fig. 6), dérivées de l'acide oxalacétique conduisent très facilement à la β-décarboxylation, comme dans le cas des acides β-céto-dicarboxyliques.

c) Influence des ions métalliques sur les enzymes à PALP.

Comme il a été dit précédemment, l'apoenzyme des enzymes à PALP paraît susceptible d'assurer plus ou moins efficacement des effets catalytiques analogues à ceux des ions métalliques dans les réactions modèles, non-enzymatiques.

A ce sujet, il convient de souligner que les métaux activent très fortement certains enzymes à PALP, tandis qu'ils sont sans effet apparent sur d'autres. C'est ainsi que, la transaminase glutamique-aspartique étudiée par Patwardan (96), et les décarboxylases de l'histine (45) et de l'acide p-aminobenzoïque (84) ne sont actives qu'en présence de PALP et d'ions Fe^{++}. Par contre, la transaminase glutamique-aspartique du coeur de pigeon, purifiée par Jenkins et Sizer (68) est active bien qu'elle ne contienne aucun ion métallique lié.

V. METABOLISME DES PYRIDOXINES

La plupart des organismes auxotrophes à l'égard des pyridoxines sont capables d'assimiler ces composés sous leurs formes non phosphorylées, aldéhydique ou alcoolique. Il semble même que, dans certains cas, comme celui de la levure Saccharomyces carlsbergensis (100,101), les composés non phosphorylés peuvent seuls pénétrer dans les cellules.

La conversion de la vitamine B_6 et de ses dérivés en pyridoxal-phosphate est réalisée par une kinase spécifique qui a été isolée et purifiée par Hurwitz (63,64) à partir de la levure de bière :

Pyridoxal + ATP ⟶ Pyridoxal-5-phosphate + ADP

Cet enzyme phosphoryle aussi la pyridoxamine, le pyridoxal et quelques autres analogues de la vitamine B_6.

Braunstein et Bukin (18) ont observé la formation de pyridoxal à partir de pyridoxol. Le pyridoxal formé était ensuite converti en acide 4-pyridoxique par l'aldéhyde oxydase du foie (108).

Une oxydase flavinique (98) découverte par Pogell dans les extraits de foie, catalyse la transformation réversible du PAMP en PALP.

Des interconversions enzymatiques entre PAL et PAM ou entre PALP et PAMP ont été observées par de nombreux auteurs (2,9,11,49,88,89,124). Récemment Wada et Snell (128) ont purifié une transaminase PAM-oxalacétate à partir d'*E. coli*. D'autre part, ces mêmes auteurs ont cristallisé une PAM-pyruvate transaminase douée d'une activité spécifique élevée à partir d'une espèce appartenant au genre Pseudomonas.

Les produits d'excrétion du métabolisme de la vitamine B_6 dans les animaux à sang chaud sont principalement l'acide 4-pyridoxique et sa lactone.

La figure 9 schématise les principales voies métaboliques du PALP et de la PAMP.

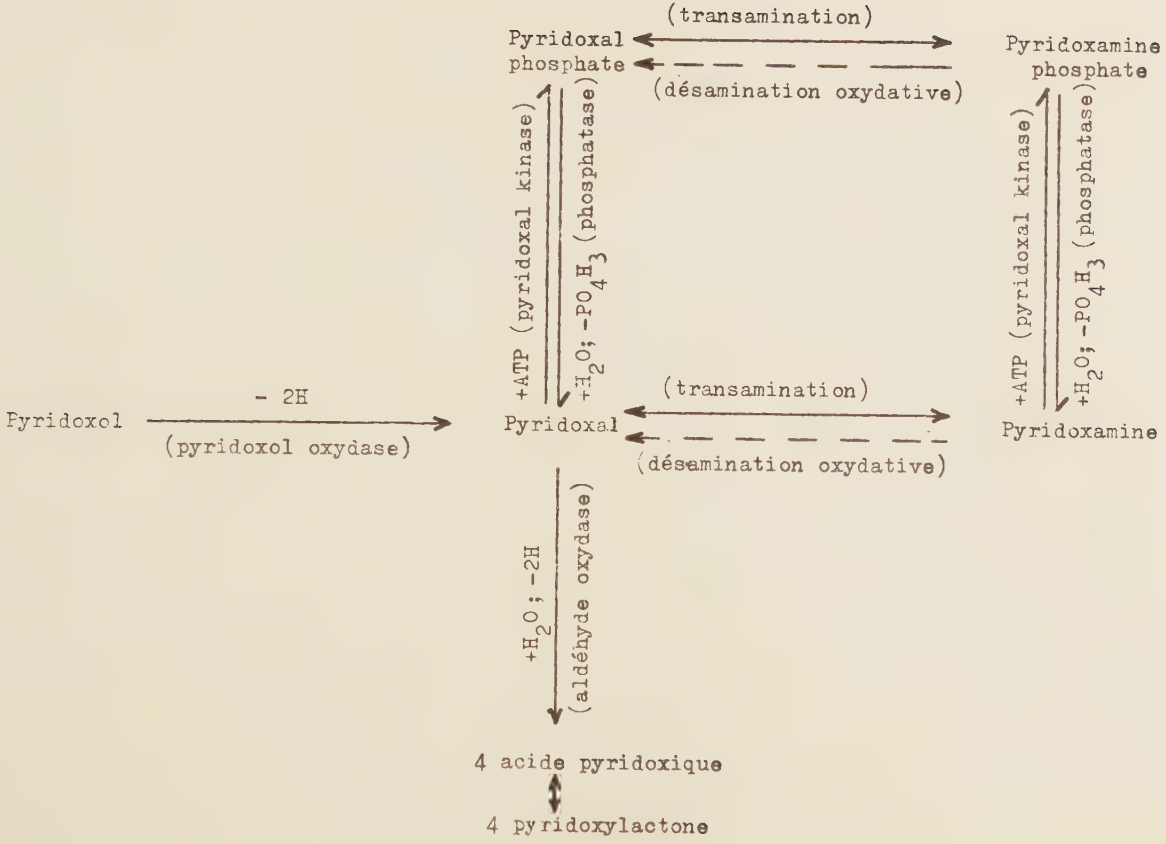


Figure 9.- Biosynthèse et catabolisme du PALP et du PAMP (20)

CHAPITRE II

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

I. PREPARATION DES EXTRAITS BRUTS.

L'organisme utilisé est la souche El Agheila Z (NCIB 83) de Desulfovibrio desulfuricans. Cette souche a été isolée en 1950 par Butlin et Postgate qui nous l'ont aimablement communiquée.

La composition du milieu employé pour les cultures est la suivante : $ClNH_4$, 2 grs ; SO_4Mg, 7 H_2O, 4 grs ; SO_4Na_2, 2 grs ; PO_4HK_2, 1 gr ; lactate de sodium, 20 grs ; extrait de levure (Difco), 5 grs ; Cl_2Ca, 2 H_2O, 0,05 gr, ClNa, 20 grs ; eau distillée, 1 litre ; pH ajusté à 6,5; stérilisation 15 min. à 120°. Dans ce milieu, contenant un excès de sulfates, la croissance est limitée par la source de carbone et d'énergie c'est-à-dire par le lactate.

Les cultures massives ont été effectuées dans des récipients en Pyrex de 20 litres ensemencés avec 500 ml d'une culture dense. L'hydrogène sulfuré présent dans l'inoculum assure l'anaérobiose. Après 48 h d'incubation à 32°, les bactéries sont récoltées par centrifugation (Sharples) et lavées avec une solution de ClNa à 2 %.

Deux méthodes d'extraction ont été utilisées : l'autolyse des bactéries séchées ou le traitement sonique des cellules fraîches.

Dans la première méthode, les bactéries lavées sont remises en suspension homogène dans un faible volume d'eau distillée, puis désséchées sous vide en présence de Cl_2Ca. Les cellules ainsi préparées peuvent être conservées à - 15° pendant plus d'un mois sans perte appréciable d'activité. Les bactéries desséchées sont remises en suspension dans de l'eau distillée (4 grs dans 60 ml) et autolysées pendant 3 heures à 32°. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation (15 000 tr/min) à + 4° pendant 10 minutes. Le surnageant recueilli est transparent, coloré en brun, et contient environ 5 mg de protéines par ml.

Dans la deuxième méthode, les bactéries lavées sont remises en suspension homogène et traitées dans un désintégrateur Raythéon (fréquence, 500 kc ; temps de traitement, 20 minutes). Les débris cellulaires sont séparés par ultracentrifugation (30 000 t/min ; 60 min.). Le surnageant obtenu est transparent et très fortement coloré en brun. Il contient environ 12 mg de protéines par ml.

II. TESTS D'ACTIVITE

a) Méthode manométrique de Warburg.

La décarboxylation de l'acide aspartique est suivie par la mesure du gaz carbonique dégagé dans les coupes de Warburg contenant le tampon et l'extrait. Dans le diverticule est placé le substrat (en général 10 µM d'acide aspartique). Les quantités d'acide aminé pouvant être détectées par cette méthode sont de 5 à 20 µmoles. Le volume total du liquide est de 3 ml. Les mesures ont été généralement effectuées à pH 5,0, pH optimum de l'enzyme, et à 37°. Pour des pH égaux ou inférieurs à 5,0, le dégagement de CO_2 est quantitatif. Pour des pH supérieurs, la solubilité du gaz s'accroît et il est nécessaire de tenir compte du volume de CO_2 dissout (125). Les activités spécifiques ($+Q_{CO_2}$) sont exprimées en µl de CO_2 dégagés par heure et par mg de protéines totales.

b) Méthode qualitative pour localiser la β aspartique-décarboxylase et la transaminase aspartique-glutamique dans les fractions chromatographiques au cours de la purification.

La technique employée tient compte du fait que la transaminase glutamique-aspartique n'est active qu'à des valeurs de pH supérieures à 6,0, c'est-à-dire dans des conditions où l'activité de la décarboxylase est très lente. Pour ces motifs, les réactions ont été effectuées dans des tubes à hémolyse sans modifier le pH des effluents provenant des colonnes de brushite (pH 6,8) et en prolongeant les essais pendant un temps suffisant pour que l'aspartique-décarboxylase puisse se manifester.

La composition des systèmes était la suivante : 0,2 ml d'acide L aspartique 0,05 M ; 0,2 ml d'α céto-glutarate 10^{-3}M ; 0,2 ml de pyridoxal phosphate (50 µg) et 1 ml de fraction chromatographique.

Les tubes sont immergés dans un bain-marie thermostatique à 37°

pendant 16 heures. La réaction est ensuite arrêtée par addition de 0,1 ml de SO_4H_2, 3,0 N et 20 µl de chacun des tubes sont chromatographiés sur papier Whatman n° 1 (méthode descendante) pendant 16 heures avec le mélange phénol-NH_4OH concentré-H_2O (80 : 0,3 : 20).

La présence de chacun des deux enzymes se traduit par la disparition plus ou moins complète de l'acide aspartique (Rf = 0,14) et l'apparition soit d'α alanine (Rf = 0,60) dans le cas de la décarboxylase, soit d'acide L glutamique (Rf = 0,21) dans le cas de la transaminase.

III. DOSAGE DES PROTEINES

Plusieurs techniques ont été employées pour mesurer la teneur en protéines des extraits et des fractions purifiées :

a) La méthode colorimétrique de Folin modifiée par Lowry (74) qui combine la réaction du biuret donnée par les liaisons peptidiques et la réaction de Folin donnée par la tyrosine et le tryptophane. La courbe de référence est établie avec de la sérum albumine de boeuf cristallisée (Fraction V).

b) La deuxième méthode qui est celle de Warburg et Christian (130), repose sur la détermination de l'absorption à 280 mµ et à 260 mµ. Le fait que les nucléoprotéines absorbent beaucoup plus fortement à 260 mµ qu'à 280 mµ a permis à Warburg et Christian d'éliminer leur interférence dans le calcul des protéines.

La concentration des protéines en mg par ml est donnée par la formule suivante :

$$F \times \frac{1}{d} \times \text{densité optique à } 280 \text{ m}\mu$$

dans laquelle F est un facteur dont la valeur dépend du rapport des absorptions à 280 et à 260 mµ et d représente la largeur de la cuve en centimètres. Cette méthode est moins spécifique et moins sensible que la première. D'autre part, elle n'est appliquable qu'à des solutions contenant moins de 20 % de nucléoprotéines et très transparentes.

c) La teneur en azote des extraits bruts a également été déterminée par la méthode titrimétrique de kjeldahl.

IV. TECHNIQUES DE PURIFICATION.

Deux méthodes ont été employées :

a) La chromatographie par adsorption sur gel de brushite ($CaHPO_4$, $2\ H_2O$), préparée suivant la technique de Tiselius et coll. (122) en versant très progressivement (4 à 5 ml/min) 500 ml de chlorure de calcium 0,5 M dans 500 ml de phosphate disodique 0,5 M agité d'une manière continue. L'état cristallographique de ces gels a été contrôlé à l'aide de diagrammes de rayons X.

Pour obtenir des chromatographies, dans des conditions reproductibles, il est préférable de laisser le gel vieillir pendant au moins un mois avant emploi. Les colonnes, préparées en versant 130 ml de gel dans un tybe pyrex de 20 mm de diamètre intérieur, sont, après 12 heures de tassement par simple décantation, soigneusement lavées par le tampon approprié.

Une circulation d'eau froide à 0° permet d'assurer le refroidissement de la colonne pendant la chromatographie. Les tampons utilisés pour l'élution ont été préparés par dilution d'une stock-solution de tampon phosphate 3,5 M à pH 6,8.

b) La chromatographie d'échange d'ions sur les dérivés de la cellulose. La carboxy-méthyl cellulose a été préparée suivant la méthode de Peterson et Sober (97) à partir de poudre de cellulose Whatman sans cendres. Le produit blanc obtenu contient 0,7 m. eq. de groupes acides par gramme.

L'adsorbant, préalablement équilibré au pH approprié, a été utilisé sous forme de colonnes de 10 cm de hauteur, dans des tubes de 20 mm de diamètre, en pyrex. L'élution a été réalisée par des tampons phosphate avec ou sans addition de ClNa.

V. DOSAGE DU PYRIDOXAL-PHOSPHATE.

Nous avons employé la méthode de Gunsalus et Smith (48). Le principe de cette méthode repose sur le fait que Streptococcus faecalis, souche R, cultivée en milieu synthétique ne contenant pas de vitamine B_6, est inactif à l'égard de la tyrosine mais forme une apodécarboxylase spécifi-

que qui est activée par l'addition de phosphate de pyridoxal.

Les bactéries sont cultivées dans le milieu décrit par Gunsalus et Smith, jusqu'à ce que le pH de la culture soit égal ou inférieur à 5,0 (18 à 24 heures), centrifugées, puis lavées avec une solution de ClNa à 9 ‰. Elles sont ensuite remises en suspension dans 10 ml d'eau et desséchées sous vide en présence de chlorure de calcium. Le dosage est effectué par mesure du dégagement de CO_2 dans des coupes de Warburg. Dans le compartiment central, on ajoute 1 ml de tampon acétate 0,2 M ; 0,4 ml de préparations de cellules séchées (50 mg/10 ml) et enfin l'échantillon dans lequel on veut doser le pyridoxal-phosphate. On place ensuite 0,5 ml de tyrosine 0,03 M dans le diverticule. Après 15 minutes, la tyrosine est versée dans le compartiment central et on détermine la vitesse de dégagement du CO_2 pendant les 15 premières minutes. On opère à 31°.

La teneur en phosphate de pyridoxal dans l'échantillon dosé est déterminée par rapport à une courbe de référence obtenue avec les mêmes cellules bactériennes et des quantités connues de pyridoxal phosphate.

La méthode est spécifique pour la forme phosphorylée du pyridoxal. En effet, l'activité tyrosine-décarboxylase n'est pas restaurée par le PAMP. Cependant les cellules bactériennes contiennent une pyridoxal-kinase, grâce à laquelle le pyridoxal peut également être dosé, mais à la condition d'opérer en milieu contenant de l'adénosine triphosphate (ATP) exogène. D'autre part, nous avons observé expérimentalement (cf. Chap. IV et VI), que les cellules de S. faecalis préparées suivant la méthode de Gunsalus et Smith sont réactivées par le pyridoxamine-phosphate (PAMP) en présence d'α céto-glutarate. En ce cas, le PAMP est vraisemblablement converti en PALP, par un processus de transamination enzymatique ou purement chimique avec le céto-acide. Enfin, nous avons constaté le fait important que, dans le cas au moins de la 4-aspartique décarboxylase, la technique de dosage par S. faecalis nécessite que le PALP soit libéré de sa combinaison avec l'apoprotéine. C'est ce que démontre le fait (cf. Chap. IV et VI) que la 4-aspartique-décarboxylase purifiée ne réactive l'activité tyrosine-décarboxylase qu'après hydrolyse alcaline par ébullition pendant 5 minutes dans la soude 0,1 M.

Une difficulté de la méthode réside dans le procédé de séchage des cellules bactériennes. Il est essentiel que les bactéries soient séchées en présence de chlorure de calcium, dans un dessicateur où est

réalisé un vide suffisant pour congeler la suspension bactérienne et réaliser une véritable lyophilisation. Lorsque ces conditions sont obtenues, les cellules donnent une poudre très légère qui se met facilement en suspension dans le tampon.

Une seconde méthode repose sur la résolution de la tyrosine-décarboxylase extraite de cultures de S. faecalis sur milieu complexe à base d'amino-acides et d'extrait de levure. On prépare une poudre acétonique que l'on autolyse pendant 21 h dans un tampon phosphate 0,022 M pH 5,5. Après centrifugation, le surnageant est soumis à une précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation. On redissout le précipité dans un faible volume d'eau. On ajoute alors un volume égal de solution saturée de sulfate d'ammonium contenant 10 % d'ammoniaque puis deux volumes de solution saturée. Le mélange est abandonné à la température ambiante pendant 2 heures. Après centrifugation, le sédiment est redissout dans de l'eau et le pH de la solution est ajusté à 5,5. La préparation obtenue ne décarboxyle pas la tyrosine mais retrouve son activité après addition de pyridoxal-phosphate.

Cette méthode ne donne pas toujours lieu à une séparation complète de l'apoenzyme et du coenzyme.

VI. DOSAGE DES PHOSPHATES.

Les phosphates ont été dosés par la méthode de Summer (119). La quantité de phosphore à doser doit être comprise entre 0 et 200 µg. Les lectures de densité optique ont été faites dans un photocolorimètre en employant un filtre Wraten rouge n° 29.

VII. DESSALAGE DES FRACTIONS PURIFIEES ET CONCENTREES.

Pour éliminer les sels des solutions d'enzyme purifié, nous avons employé la méthode de Porath et Flodin (98 bis) qui consiste en une filtration sur gel de dextrane ou sephadex. Ces gels sont constitués par des chaînes de polysaccharides qui forment un réseau macromoléculaire de grande stabilité. Les petites molécules diffusent librement dans le gel

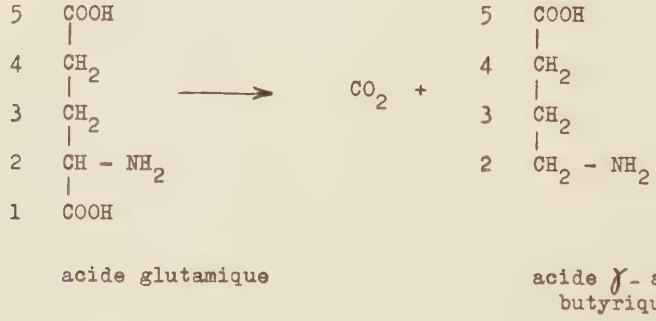
tandis que les grosses molécules ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur du réseau.

Pour la préparation des colonnes, 6 grs de séphadex sont mis en suspension dans une solution de ClNa à 1 % pendant 2 h. La solution est ensuite versée dans un tube en pyrex de 2 cm de largeur et mise à sédimenter. Le lavage de la colonne ainsi que l'élution sont réalisés avec de l'acide chlorhydrique N/1000.

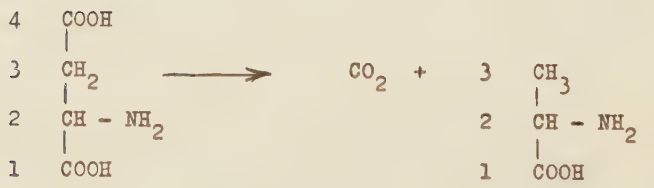
CHAPITRE III

PROPRIÉTÉS DES AMINO-ACIDES DÉCARBOXYLASES PRÉSENTÉS DANS LES EXTRAITS BRUTS

Les cellules entières et les extraits bruts de la souche El Agheila Z de Desulfovibrio desulfuricans décarboxylent l'acide glutamique en acide γ-aminobutyrique et l'acide aspartique en α-alanine, suivant les réactions :



acide glutamique — acide γ-amino-butyrique



acide aspartique — α alanine

La glutamique-décarboxylase a été mise en évidence chez plusieurs autres organismes et a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Pour cette

raison, nous avons principalement étudié l'aspartique-décarboxylase qui présente la particularité intéressante d'attaquer le groupement β carboxyle alors que le lieu d'action de toutes les autres décarboxylases est le groupement carboxyle situé à proximité de la fonction aminée.

Comme il a déjà été dit dans le chapitre précédent, la 4 aspartique décarboxylase avait été antérieurement découverte chez une Mycobactérie non identifiée (77) et chez Clostridium welchii (87). En ce qui concerne les bactéries sulfato-réductrices, nous avons recherché sans succès cet enzyme chez de nombreuses autres souches de D. desulfuricans conservées au laboratoire (Canet 41, NCIB 8394, Hildenborough, NCIB 8303, Vibrio cholinicus). Par contre, ces souches, comme la souche El Agheila Z, possèdent des transaminases et, notamment, une transaminase aspartique-glutamique. A ce sujet, il convient de signaler que dans certains cas, et notamment dans celui de la souche El Agheila Z, cette dernière transaminase ne peut être mise en évidence avec les cellules entières, mais seulement avec des extraits. Les raisons de ce comportement, peut-être lié à la perméabilité cellulaire, n'ont pas été étudiées expérimentalement.

Dans une série d'expériences préliminaires, nous avons également recherché la 4 aspartique-décarboxylase chez un certain nombre d'espèces bactériennes différentes et notamment chez Escherichia coli, Streptococcus faecalis, Aerobacter aerogenes, Bacillus subtilis et Pseudomonas aeruginosa. Ces essais ont tous donné des résultats négatifs.

A l'égard de l'acide aspartique et de l'acide glutamique, les extraits bruts obtenus par autolyse de D. desulfuricans, souche El Agheila Z présentent les propriétés suivantes :

1) Spécificité.

La figure 10 montre que les extraits produisent une mole de CO_2 par mole d'acide glutamique ou d'acide aspartique. Nous avons vérifié à l'aide de la chromatographie sur papier que les produits résultant de la décarboxylation sont exclusivement l'acide γ aminobutyrique d'une part et l'α alanine de l'autre. On voit sur la figure 11 que seule la forme L de l'acide aspartique est attaquée par l'enzyme.

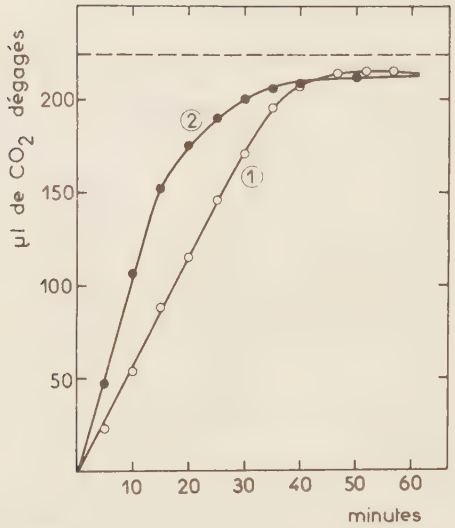


Figure 10.- Décarboxylation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique par des extraits bruts d'El Agheila Z. Conditions expérimentales : tampon phosphate-citrate pH 5,0 ; t° 37° ; extrait brut, 1 ml (7 mg de protéines). Courbe (1) acide aspartique 10 µM ($3,3.10^{-3}$M). Courbe (2) acide glutamique 10 µM ($3,3.10^{-3}$M). La ligne discontinue représente la quantité théorique de CO_2 correspondant à 10 µM de substrat.

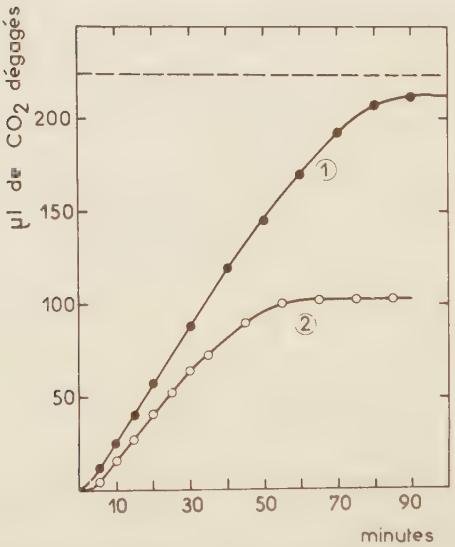


Figure 11.- Spécificité de l'aspartique-décarboxylase pour la forme L. Conditions expérimentales : tampon acétate-acide acétique pH 5,0 ; t° 37° ; PALP : 50 mµg ($6.2.10^{-3}$M). Extrait, 1 ml (6,1 mg de protéines). Courbe (1) acide L aspartique 10 µM ($3,3.10^{-3}$M). Courbe (2) acide DL aspartique 10 µM.

Aucun dégagement gazeux ne se manifeste en présence des composés suivants : L lysine, DL histidine, L cystéine, L tyrosine, L arginine, L alanine, DL sérine, DL phénylalanine, DL thréonine, L tryptophane et DL méthionine. Nous avons également observé que les extraits ne décarboxylent aucun des analogues structuraux de l'acide aspartique, et notamment l'acide cystéique, l'hydroxamate de l'acide DL aspartique et le β méthyl-DL aspartique.

2) Activité aspartique-décarboxylase en fonction de la quantité d'enzyme.

Dans les conditions de nos expériences, la vitesse de dégagement du CO_2 est proportionnelle au volume d'extrait (Fig. 12).

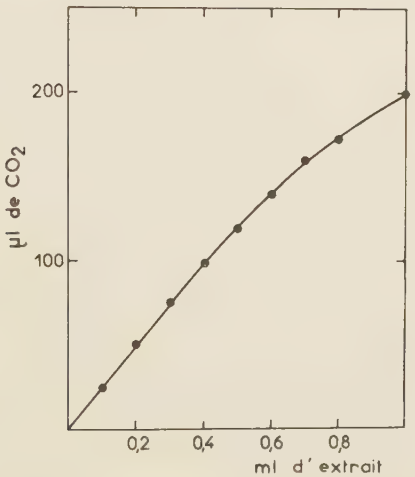


Figure 12.- Vitesse de décarboxylation de l'acide L aspartique en fonction du volume d'extrait. La vitesse est exprimée par le nombre de µl de CO_2 dégagés en 15 min. Conditions expérimentales : tampon acétate pH 5,0, t° 37° ; PALP : 50 mµg ($6.2.10^{-3}$M) ; acide L aspartique 10 µM ($3,3.10^{-3}$M), 1 ml d'extrait contenait 12 mg de protéines.

3) Constantes d'affinité.

Nous avons déterminé les constantes de Michaëlis des deux enzymes (Fig. 13). On trouve respectivement $K_m = 6.10^{-4}$M et $K_m = 5,8\ 10^{-3}$M pour l'aspartique et la glutamique-décarboxylase . Dans le cas de l'acide aspartique, les concentrations de substrat qui doivent être employées sont trop faibles pour permettre une détermination précise, et la valeur qui est donnée constitue seulement un ordre de grandeur. Il est inté-

réssant de constater que l'affinité de l'aspartique-décarboxylase pour son substrat est environ dix fois plus élevée que celle de la glutamique-décarboxylase.

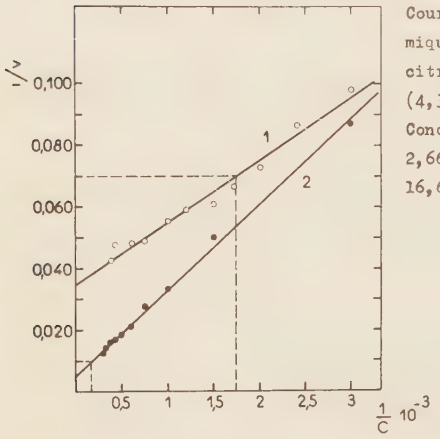


Figure 13.- Détermination graphique de la constante de Michaëlis. Courbe (1) acide L aspartique. Courbe (2) acide L glutamique. Conditions expérimentales : tampon phosphate-citrate pH 5,0, t° 37° ; PALP : 50 mμg. Extrait, 1 ml (4,3 mg de protéines).
Concentrations en substrat variant de $0,33.10^{-3}$M à $2,66.10^{-3}$M pour l'acide aspartique et de $0,33.10^{-3}$M à $16,6.10^{-3}$M pour l'acide glutamique.

4) Action des acides α cétoniques.

L'addition de faibles quantités de céto-acides provoque généralement un accroissement sensible de l'activité des extraits bruts à l'égard de l'acide aspartique. Comme nous le verrons plus loin, le phénomène est plus net lorsqu'on utilise des extraits purifiés au sulfate d'ammonium. On obtient également une activation plus notable avec des extraits dialysés (Tableau II).

TABLEAU II

Action des céto-acides sur l'aspartique-décarboxylase

	Q_{CO_2}/hre/ml d'extrait		
	sans addition	+ α céto-glutarate **	Activation
Extrait non dialysé	286	364	27 %
Extrait dialysé *	123	240	50 %

* Dialyse contre eau distillée pendant 20 heures
** Concentration en α céto-glutarate, 10^{-3} M.

Une concentration en céto-acide 10^{-4} M est suffisante pour obtenir l'activation maximum.

La plupart des expériences décrites dans ce travail ont par suite été réalisées en présence de céto-acides.

5) Action du pyridoxal-phosphate.

Après dialyse contre de l'eau distillée, les extraits bruts perdent une partie de leur activité (Fig. 14). Toutefois on n'observe jamais une inactivation complète même après des temps de dialyse proches de 96 h, ce qui semble indiquer qu'une fraction du coenzyme reste fermement liée à l'apoenzyme.

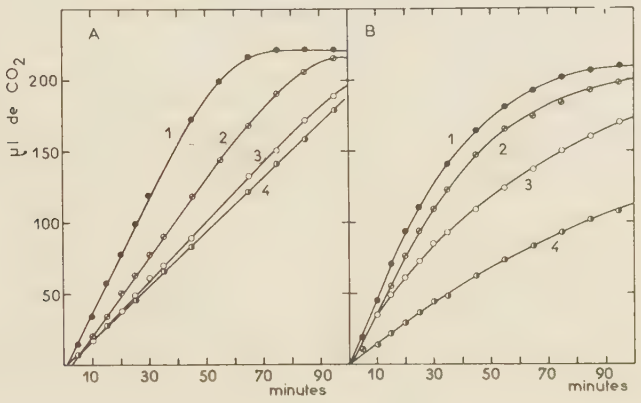


Figure 14.- Diminution de l'activité des extraits bruts à l'égard de l'acide aspartique et de l'acide glutamique en fonction du temps de dialyse. Schéma A : acide aspartique 10 µM. Schéma B : acide glutamique 10 µM. Conditions expérimentales : tampon phosphate-citrate pH 5,0, t° 37° ; extrait 1 ml (3,9 mg de protéines). Temps de dialyse : Courbe (1), 0 h ; courbe (2), 3 h ; courbe (3), 17 h ; courbe (4), 41 h.

Dans le cas de l'aspartique-décarboxylase, l'activité peut être restaurée par l'addition de pyridoxal-phosphate ou de céto-acides, qui ont des actions pratiquement identiques (Fig. 15).

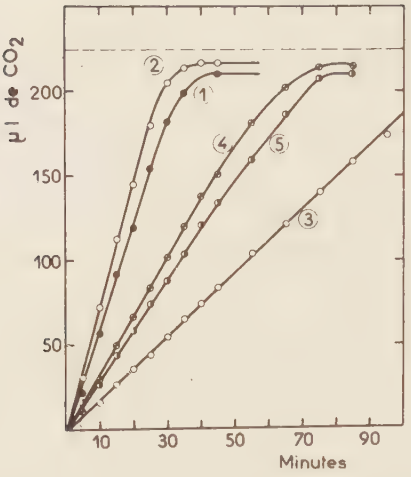


Figure 15.- Activation d'un extrait brut dialysé à l'égard de l'acide aspartique par les céto-acides et le pyridoxal-phosphate. Conditions expérimentales : tampon phosphate-citrate pH 5,0, t° 37° ; acide L aspartique 10 µM ; extrait, 1 ml. Courbe (1) : extrait non dialysé. Courbe (2) : extrait non dialysé + α céto-glutarate 10^{-4}M. Courbe (3) : extrait dialysé 96 heures contre de l'eau distillée. Courbe (4) : extrait dialysé + α céto-glutarate 10^{-4}M. Courbe (5) : extrait dialysé + pyridoxal-phosphate $6,2.10^{-3}$M.

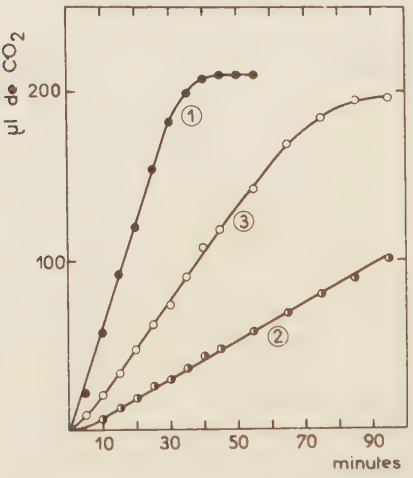


Figure 16.- Réactivation par le pyridoxal-phosphate d'un extrait brut soumis à des radiations ultraviolettes. Conditions expérimentales : tampon phosphate-citrate pH 5,0, t° 37° ; acide L aspartique 10 µM ; extrait 1 ml. Courbe (1) : extrait brut non dialysé. Courbe (2) : extrait brut traité par les rayons ultraviolets pendant 2 heures. L'extrait enzymatique était placé à 9 cm au dessous de la lampe et refroidi dans un bain de glace. Courbe (3) : extrait traité aux ultra-violets + pyridoxal-phosphate $6,2.10^{-3}$M.

On sait que les dérivés du pyridoxol sont sensibles à la lumière ultraviolette (107). Pour cette raison, nous avons irradié un extrait dans les conditions indiquées sur la figure 16. On observe une inactivation de 80 % qui est partiellement supprimée par l'addition de pyridoxal-phosphate. Dans ce cas, les céto-acides n'exercent aucun effet réactivateur.

6) Activité en fonction du pH. Influence des tampons.

La figure 17 montre que les deux décarboxylases présentent une activité optimum à pH 5,0. On voit également que l'enzyme qui attaque l'acide glutamique est beaucoup plus sensible aux variations de pH que la décarboxylase de l'acide aspartique. En effet, à pH 3 et 6 par exemple les extraits n'ont plus aucune activité à l'égard de l'acide glutamique alors qu'ils possèdent encore une activité notable à l'égard de l'acide aspartique.

En tampon acétate, le maximum d'activité de l'aspartique-décarboxylase se déplace vers les pH acides et se trouve situé à pH 4,2. L'activité est plus élevée qu'en tampon phosphate-citrate.

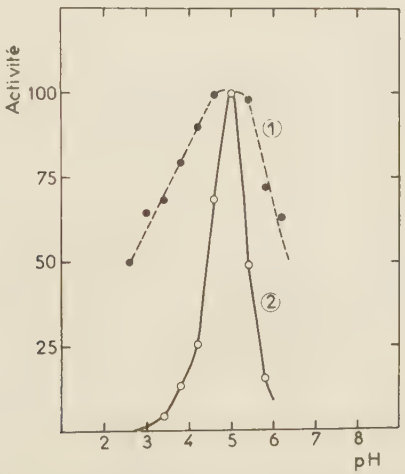


Figure 17.- Activités des décarboxylases de l'acide aspartique et de l'acide glutamique en fonction du pH. Conditions expérimentales : tampons phosphate-citrate 0,2 M, t° 37° ; extrait 1 ml (4,5 mg de protéines). Courbe (1) : acide L aspartique 10 µM. Courbe (2) : acide L glutamique 10 µM. Les activités sont exprimées en pour cent de l'activité maximum.

Pour la glutamique-décarboxylase, on observe un comportement inverse comme on le voit sur le tableau III et l'activité est maximum en tampon phosphate-citrate.

Shukuya et Schwert (113) ont également constaté que l'acétate inhibe l'activité de la glutamique-décarboxylase et ont montré que cette inhibition est compétitive avec le substrat.

TABLEAU III

Activités comparées des deux décarboxylases en tampon acétate et en tampon phosphate-citrate

	Q_{CO_2}/hre/ml d'extrait	
	Tampon acétate	Tampon phosphate-citrate
Acide aspartique	309	190
Acide glutamique	96	170

Nous avons étudié l'influence de la nature du tampon sur l'activité de la β aspartique-décarboxylase. Le tableau IV résume les résultats obtenus.

TABLEAU IV

Activités relatives de l'aspartique-décarboxylase en différents tampons par rapport à la valeur de l'activité en tampon acétate ramenée à 100.

Tampons	Activités
Acétate-acide acétique (0,2 M)	100
Phosphate (0,1 M)-citrate (0,05 M)	66
Citrate-acide citrique (0,05 M)	60
Phosphate de potassium + potasse PO_4H_2K + KOH (0,2 M)	83
Succinate (0,05 M)	25
Phtalate (0,05 M)	39

Ces expériences ne permettent pas de déterminer les raisons pour lesquelles certains tampons, et notamment ceux contenant des acides poly-carboxyliques, exercent une inhibition dans certains cas très marquée sur l'activité enzymatique. Etant donné le rôle des ions métalliques (cf chap. V), il est néanmoins vraisemblable que ces effets soient liés au pouvoir complexant des tampons considérés.

Les différents systèmes employés pour l'étude de l'influence du pH sur l'activité aspartique-décarboxylase ont été chromatographiés en fin d'expérience. On a ainsi constaté, dans ces systèmes qui étaient, comme il a déjà été dit, activés par l'addition d'α céto-glutarate, qu'à pH 6,2, il se forme de l'acide glutamique. Cette observation montre que l'aspartique-glutamique-transaminase contenue dans les extraits bruts n'est active que dans ces conditions de pH, et n'a aucune activité dans la zone des pH optimums pour les décarboxylases.

D'autre part, nous avons observé la formation d'un précipité à des pH égaux ou inférieurs à 5. Après centrifugation, on retrouve la totalité de l'activité aspartique-décarboxylase dans le surnageant. Cette observation fortuite nous a conduits à introduire la précipitation acide dans les techniques de purification.

7°) Influence de la température.

L'influence de la température sur l'activité aspartique-décarboxylase a été déterminée entre + 30° et + 45° C. Les résultats de ces expériences sont rassemblés sur la fig. 18 où, conformément à la représentation classique, on a porté le logarithme de l'activité (V) en fonction de l'inverse de la température absolue (1/T). On voit que, dans cette gamme de température, l'activité suit la loi d'Arrhénius avec une approximation très satisfaisante. L'énergie d'activation (E), encore dit "incrément critique de température", a été calculée d'après l'expression

$$E = -4{,}544 \; \underline{d} \, (\log 10 \; V) \; / \; \underline{d} \, (\tfrac{1}{T})$$

Les valeurs numériques trouvées sont de 5 700 calories (Fig. 18) et 5 900 dans une autre série de déterminations. Il est à noter que l'enzyme est remarquablement thermo-résistant, son inactivation thermique ne débutant qu'au delà de + 45° C. On a constaté qu'un chauffage de 10 minutes

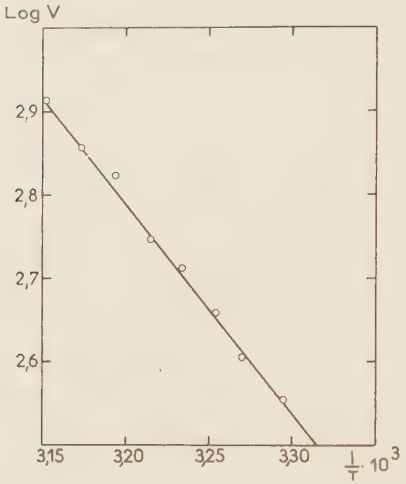


Figure 18.- Influence de la température sur l'activité de l'aspartique décarboxylase. Conditions expérimentales : tampon acétate, 0,33 M pH 5,0, acide aspartique 10 µM ; PALP : 50 mµg ($6,2.10^{-3}$M) ; extrait brut, 1 ml (6,5 mg de protéines). Les variations de température ont été effectuées de 30 à 45° à des intervalles de 2°.

à + 65° C ne détermine aucune perte d'activité.

8) Action des inhibiteurs

Le pyridoxal-phosphate étant un aldéhyde, l'action des inhibiteurs de cette fonction a été étudiée. La semi-carbazide et l'hydroxylamine inhibent les deux décarboxylases sensiblement dans les mêmes proportions (tableau V) mais le degré d'inhibition varie avec la nature du tampon.

TABLEAU V

Inhibition par la semi-carbazide en tampon acétate pH 5,0

Concentration en inhibiteur	Aspartique décarboxylase	Glutamique décarboxylase
$6. 10^{-3}$ M	75 %	86 %
$6. 10^{-4}$ M	25 %	30 %

En tampon phosphate-citrate l'inhibition des deux décarboxylases est complète pour une concentration de semi-carbazide ou d'hydroxylamine de $6 . 10^{-3}$ M. Le pyruvate ou l'α céto-glutarate à une concentration de 10^{-3} M restaure complètement l'activité de l'aspartique-décarboxylase et partiellement celle de la glutamique-décarboxylase.

Plusieurs chercheurs (90,13) ont observé que l'hydrazide de l'acide isonicotinique ou isoniazide, employé dans le traitement de la tuberculose, a un effet antivitaminique B_6. Les patients traités avec de grandes quantités d'isoniazide montrent les symptomes d'une déficience en vitamine B_6 et en excrètent des quantités importantes dans les urines (13). L'élimination de la vitamine B_6 par l'isoniazide a pour conséquence l'abaissement des activités transaminases dans les tissus (90,19).

Le mécanisme proposé pour l'inhibition des enzymes à pyridoxal-phosphate repose sur la formation d'une hydrazone entre l'isoniazide et le groupe aldéhyde du pyridoxal-phosphate (27,133).

Nous avons recherché l'action de ce composé sur la décarboxylase de l'acide aspartique dans différents tampons et nous avons comparé son action à celles des autres inhibiteurs (Tableau VI), (20 a).

TABLEAU VI

Inhibition de l'aspartique-décarboxylase à pH 5 et à 37°

	Tampon acétate		Tampon phosphate		Tampon phosphate-citrate	
	Q_{CO_2}	Inhibition	Q_{CO_2}	Inhibition	Q_{CO_2}	Inhibition
Sans inhibiteur	161		134		115	
Isoniazide 10^{-2}M	143	11 %	114	15 %	51	55 %
Semi-carbazide $6 . 10^{-3}$M	61	62 %	22	84 %	0	100 %
Hydroxylamine $6 . 10^{-3}$M	11	93 %	0	100 %	0	100 %

Ce tableau montre que, d'une manière générale, la décarboxylase présente une sensibilité maximum aux inhibiteurs en tampon phosphate-citrate. D'autre part, l'isoniazide se révèle un inhibiteur beaucoup moins puissant que la semi-carbazide et l'hydroxylamine. Cependant la dialyse de l'extrait augmente la sensibilité de la décarboxylase à l'isoniazide. En effet, l'inhibition atteint 87 % à pH 4,0 pour une concentration 10^{-2}M alors qu'elle n'est que de 55 % avec un extrait non dialysé.

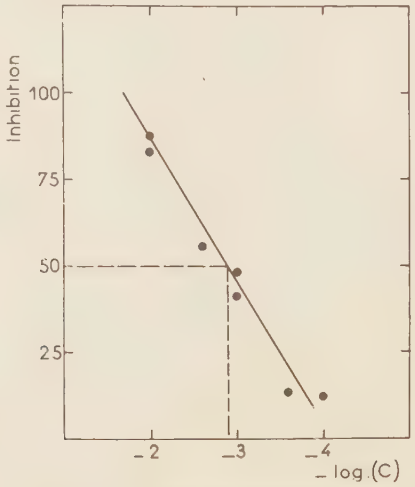


Figure 19.- Inhibition de l'aspartique-décarboxylase en fonction de la concentration en isoniazide. Conditions expérimentales : tampon phosphate-citrate pH 4,0, acide L aspartique 10 µM, extrait brut, 1 ml (5,2 mg de protéines), t° 37°.

La figure 19 montre que le taux d'inhibition est proportionnel au logarithme de la concentration en isoniazide. Cette inhibition est d'autant plus marquée que le pH est plus acide (Fig. 20).

Cette dernière observation est en accord avec les expériences de Jenkins, Orlowski et Sizer (67) sur la transaminase glutamique-aspartique. En effet ces auteurs ont constaté, en étudiant les constantes de dissociation des complexes formés entre l'isoniazide et l'enzyme, que la forme acide de la transaminase a une plus grande affinité pour l'isoniazide que la forme basique.

L'addition de pyridoxal-phosphate restaure l'activité initiale de l'enzyme inhibé par l'isoniazide (Fig. 21). Enfin nous avons constaté que les céto-acides réactivent aussi les extraits inhibés à des concentrations inférieures à celles de l'inhibiteur ce qui montre qu'ils

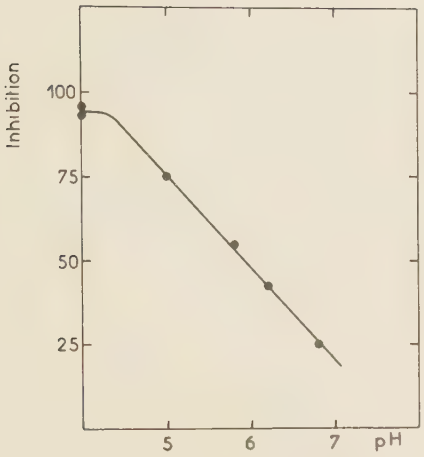


Figure 20.- Inhibition de l'aspartique-décarboxylase en fonction du pH. Conditions expérimentales : tampon phosphate-citrate 0,2 M, acide L aspartique 10 µM, extrait brut, 1 ml (5,2 mg de protéines), Isoniazide 10^{-2}M, t° 37°.

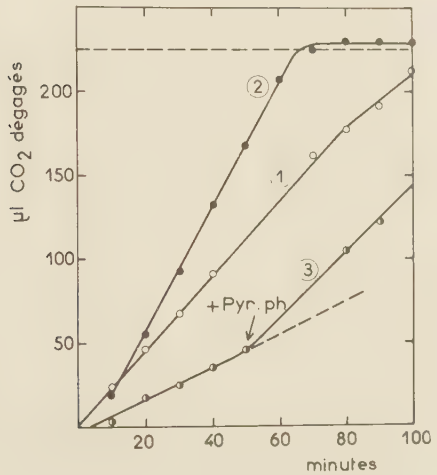


Figure 21.- Activation et réactivation par le pyridoxal-phosphate de l'aspartique-décarboxylase. Conditions expérimentales : tampon phosphate-citrate pH 4,0 ; acide aspartique 10 µM. Extrait brut dialysé 3 h. 1,0 ml. Courbe (1) : acide aspartique. Courbe (2) : acide aspartique + PALP 10^{-3}M. Courbe (3) : acide aspartique + isoniazide 10^{-3}M. Au temps indiqué par la flèche, addition de pyridoxal-phosphate 10^{-3}M.

n'agissent pas par simple réaction chimique avec l'isoniazide (Fig. 22). Leur action se situe vraisemblablement au niveau du coenzyme.

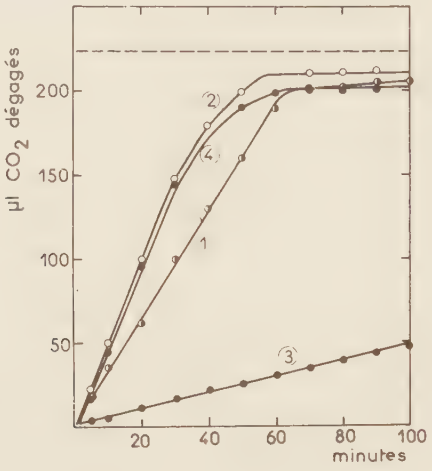


Figure 22.- Réactivation par l'α céto-glutarate de l'aspartique-décarboxylase inhibée par l'isoniazide. Conditions expérimentales : tampon phosphate-citrate pH 4,0 ; acide aspartique 10 µM ; extrait brut dialysé 3 h, 1 ml. Courbe (1) : acide aspartique. Courbe (2) : acide aspartique + α céto-glutarate 10^{-2}M. Courbe (3) : acide aspartique + Isoniazide 10^{-2}M. Courbe (4) : acide aspartique + Isoniazide 10^{-2}M + α céto-glutarate 10^{-2}M.

Le tableau VII illustre ces résultats.

Nous avons utilisé deux autres composés de la même famille que l'isoniazide : l'hydrazide de l'acide nicotinique et le marsilid (1-isonicotinyl- 2 isopropylhydrazine phosphate). Le marsilid qui a un groupe aminé substitué terminal n'est pas un inhibiteur de la décarboxylase (tableau VIII).

La cyclosérine 10^{-2} M inhibe 86 % de l'activité en tampon phosphate-citrate et 47 % en tampon acétate.

Les formules de ces différents inhibiteurs sont montrées dans la figure 23.

TABLEAU VII

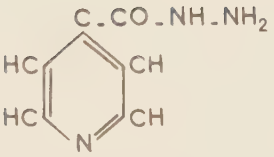
Inhibition de l'aspartique-décarboxylase par l'isoniazide

Additions	Activités		Inhibition
	sans isoniazide	avec isoniazide 10^{-2}M	%
	100	12,8	87
+ pyridoxal-phosphate 10^{-3}M	169	102	35,5
+ α céto-glutarate 10^{-3}M	173	173	0
10^{-4}M	161	151	7,5
10^{-5}M	139	109	22
10^{-6}M	128	39,5	69

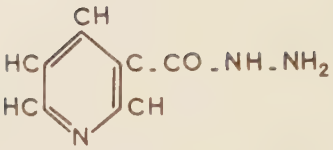
TABLEAU VIII

Inhibition de l'aspartique-décarboxylase par les dérivés de l'acide nicotinique

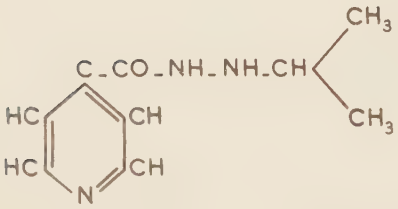
	Isoniazide		Hydrazide nicotinique		Marsilid	
Concentration	10^{-2}	10^{-3} M	10^{-2}	10^{-3} M	10^{-2}	10^{-3} M
Inhibition %	67	17	57	20	10	3



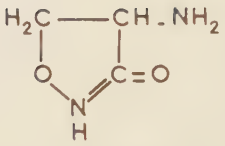
hydrazide de l'acide
isonicotinique



hydrazide de l'acide
nicotinique



marsilid



D cyclosérine
4 amino-3 isoxazolidone

Figure 23.-

CHAPITRE IV

PURIFICATION SUR GEL DE BRUSHITE SÉPARATION DES ENZYMES

L'activation par les céto-acides de l'aspartique-décarboxylase peut à priori s'expliquer en supposant que la formation d'α alanine à partir d'acide aspartique résulte de transaminations successives, suivant un schéma envisagé par Meister (87).

(1) $COOH-CH_2-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + R-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH \rightleftharpoons COOH-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH + R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH$

acide aspartique — acide oxalo-acétique

(2) $COOH-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH \longrightarrow CO_2 + CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH$

acide pyruvique

(3) $CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH + R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH \rightleftharpoons CH_3-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + R-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH$

α alanine

Nous allons voir que la purification sur gel de brushite nous a permis d'éliminer définitivement cette hypothèse. En effet, nous avons séparé par cette technique chromatographique la transaminase glutamique-aspartique de la décarboxylase et ainsi démontré l'indépendance des deux enzymes (20 b).

I. PURIFICATION DE L'ASPARTIQUE-DECARBOXYLASE

Stade I : Précipitation des nucléoprotéines par le sulfate de streptomycine.

Les extraits bruts sont obtenus par autolyse des bactéries séchées pendant trois heures à 32°. Leur activité spécifique varie entre 30 et 70 µl de CO_2 dégagé par heure et par mg de protéines. Ils contiennent une proportion élevée de nucléoprotéines (environ 17 %) ce qui se traduit par un rapport d'absorption 280/260 mµ de l'ordre de 0,7 ; l'élimination d'une partie de ces nucléoprotéines est effectuée par précipitation au moyen de sulfate de streptomycine (4 mg par ml d'extrait). Il se forme un précipité abondant qui est éliminé par centrifugation à faible vitesse (3 000 t/min). Cette précipitation doit être effectuée en l'absence d'électrolyte ou à une concentration inférieure à 0,1 M.

Le surnageant est dialysé pendant une heure contre de l'eau distillée. Son activité initiale n'a presque pas diminué et le rapport 280/260 mµ s'élève à 0,9 environ.

Un autre procédé, que nous avons employé, consistait à traiter 60 ml d'extrait brut par 1 mg de ribonucléase et 1 mg de désoxyribonucléase à + 32° pendant une heure en présence de sulfate de magnésium 2.10^{-3}M . Comme cette technique ne donnait pas de résultats meilleurs que le traitement par la streptomycine, ce dernier a, par la suite, été préféré à cause de sa plus grande simplicité.

Stade II. Précipitation acide.

Le surnageant de la précipitation à la streptomycine est amené à pH 5 par addition de 0,1 volume de tampon acétate 1,0 M. Ce traitement élimine quelques protéines inactives mais surtout des substances non protéiques car l'activité spécifique et le rapport 280/260 mµ ne varient pas sensiblement. La suspension est centrifugée à faible vitesse (3 000 t/min, + 4°, 10 min).

Stade III. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.

Le surnageant acide est précipité par addition de sulfate d'ammonium solide entre 0 et 60 % de saturation. Après 30 minutes, les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation. Elles contiennent la totalité de la glutamique-décarboxylase.

La transaminase glutamique-aspartique et la décarboxylase de l'acide aspartique sont précipitées ensuite entre 60 et 80 % de la saturation en

sulfate d'ammonium. Cette fraction est recueillie par centrifugation (16 000 t/min, + 4°, 10 min), dissoute dans du tampon phosphate 10^{-3} M (pH 6,8) et dialysée contre ce même tampon. Une partie de l'activité 4 aspartique-décarboxylase est perdue dans la fraction précipitée entre 50 et 60 % de saturation. A ce stade, le rendement est de 40 % et l'activité spécifique est cinq fois plus élevée que celle de l'extrait initial. D'autre part, le rapport 280/260 mμ s'élève à 1,3. La figure 24 montre l'élimination progressive des nucléoprotéines aux différents stades.

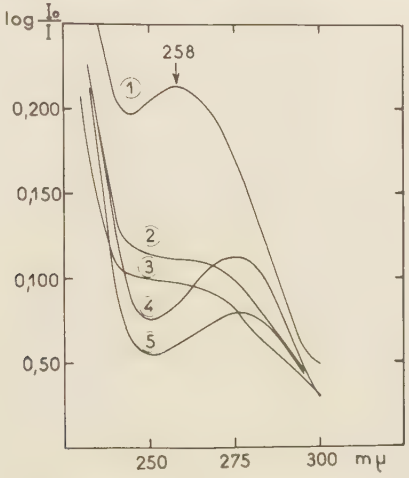


Figure 24.- Spectres d'absorption aux différents stades de la purification : (1) extrait brut initial ; (2) après traitement par le sulfate de streptomycine ; (3) après acidification à pH 5,0 ; (4) après fractionnement par le sulfate d'ammonium ; (5) après passage sur gel de brushite.

Stade IV. Chromatographie d'adsorption sur gel de brushite.

Sur une colonne de brushite préparée suivant la méthode décrite précédemment et lavée par du tampon phosphate 0,01 M, on introduit 10 ml de la solution provenant du stade III.

Une expérience préliminaire effectuée avec un gradient continu nous a indiqué que la décarboxylase est éluée par le tampon 0,2 M à pH 6,8. Par la suite, nous avons utilisé un gradient de concentration discontinu à pH constant.

Des tampons de force ionique 0,1 ; 0,2 et 0,3 M ont été passés

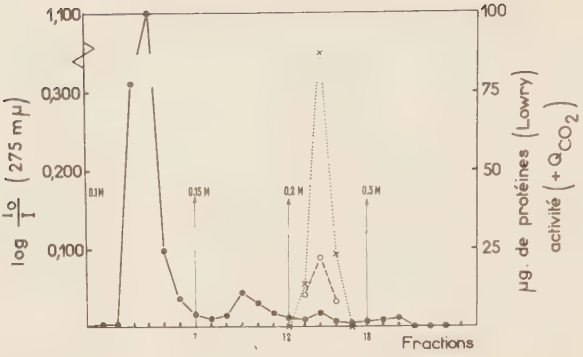


Figure 25.- Exemple de purification par chromatographie d'adsorption sur gel de brushite : -●-●- densités optiques à 275 mμ ; -O-O concentrations en protéines (μg/ml) déterminées par la méthode de Lowry et coll. (74) sur les trois fractions actives ; - x - x - activité aspartique décarboxylase (+ Q_{CO_2}/ml de fraction chromatographique.

successivement. Des fractions de 10 ml étaient recueillies. Leur teneur en protéines était suivie par la mesure de l'absorption à 280 mμ. La figure 25 montre un exemple de purification : la majeure partie des protéines est éluée avec le tampon 0,1 M. Ces fractions, colorées en jaune, contiennent la transaminase glutamique-aspartique. Le tampon 0,15 M élue une protéine nettement colorée en vert, qui correspond à la désulfoviridine décrite par Postgate (99).

La 4 aspartique-décarboxylase est éluée par le tampon 0,2 M et se trouve répartie en général dans 3 ou 4 fractions. L'activité spécifique n'est pas la même dans les différentes fractions, ce qui indique que le pic de protéines est encore hétérogène. Mais l'estimation de l'activité spécifique est rendue difficile à cause de la très faible teneur en protéines des fractions actives. De plus l'enzyme, n'étant pas stable en solution très diluée, il est possible qu'il se dénature plus vite dans les fractions où il est plus dilué. Des essais pour améliorer la séparation en employant des tampons de concentration intermédiaire entre 0,15 M et 0,2 M n'ont pas donné de bons résultats, mais provoquaient au contraire un étalement de l'activité enzymatique.

Un dernier pic de protéines est élué par le tampon 0,3 M. La figure 26 montre la séparation de la transaminase et de la décarboxylase par chromatographie sur papier. On voit que la formation d'acide glutamique se

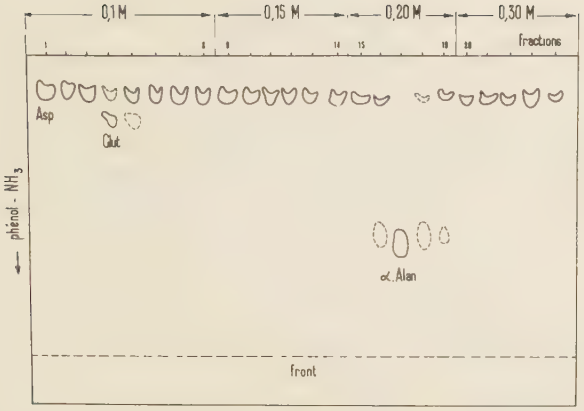


Figure 26.- Localisation de la 4-aspartique_décarboxylase et de la transaminase aspartique-glutamique dans les effluents d'une colonne de brushite : essai qualitatif des fractions chromatographiques (conditions expérimentales précisées dans le chapitre II). La présence de la 4-aspartique décarboxylase se traduit par la formation d'α-alanine (α-Ala), et celle de la transaminase aspartique-glutamique par la formation d'acide glutamique (Glu).

produit exclusivement dans les systèmes correspondant au premier pic de protéines, ce qui indique que la transaminase glutamique-aspartique n'est présente que dans ces fractions. On voit, d'autre part, que l'α alanine n'est formée que dans les systèmes correspondant au troisième pic de protéines, et, par conséquent, qu'elle provient bien d'une décarboxylation directe de l'acide aspartique, sans transaminations intermédiaires.

Le fait déjà rapporté (Chapitre III) que la transaminase glutamique_aspartique n'est pas active aux pH inférieurs à 6,2, est un autre argument contre l'hypothèse des transaminations intermédiaires. Ces conclusions confirment celles de Meister (87) fondées sur la fait que, dans le cas de Clostridium welchii, l'α alanine produite à partir d'acide aspartique non radioactif et en présence de pyruvate marqué par ^{14}C n'est pas radioactive.

Sur les tableaux IX et X, on a rassemblé à titre d'exemple les résultats d'une purification sur gel de brushite, et une comparaison entre plusieurs expériences différentes.

TABLEAU IX

Schéma d'une purification

	Activité spécifique *	Purification	Rendement %
Extrait brut	64,7	-	100
Stade I (Streptomycine)	70,8	x 1,09	100,4
Stade II (pH 5,0)	68,9	x 1,05	81
Stade III ($SO_4(NH_4)_2$)	331,9	x 5,13	40,5
Stade IV (colonne)	10 537	x 163	20.1 **

* Activités spécifiques exprimées en µl de CO_2 dégagés par heure et par mg de protéines dosées par la méthode de Lowry et coll.

** D'après l'activité totale des trois fractions chromatographiques présentant une activité enzymatique.

TABLEAU X

Résultats de plusieurs purifications différentes

Expériences	Activité spécifique initiale	Activité spécifique finale	Purification	Rendement %
1	38,9	5 866	x 151	12,4
2	36,7	4 300	x 120	12,6
3	64,7	10 537	x 163	20,1
4	38,9	6 000	x 154	23,1

On voit que les rendements sont d'autant meilleurs que l'activité spécifique de l'extrait brut initial est plus élevée.

L'enzyme purifié est actif à pH 5,0 en l'absence de pyridoxal-phosphate mais l'addition soit de pyridoxal-phosphate, soit de céto-acide, double son activité, comme le montre le tableau XI.

TABLEAU XI

Activité de l'enzyme purifié

Systèmes	Q_{CO_2}
Acide aspartique seul	35
+ Pyridoxal-phosphate	69
+ céto-glutarate	74,5
+ PALP + α céto-glutarate	93

Conditions expérimentales : pH 5,0 (tampon acétate)
acide aspartique : 10 µM, ± PALP : 50 µg ; ± α céto-glutarate 0,3 M.
Enzyme purifié 1 ml (22 µg protéines) volume total : 3 ml.

II. ETUDE DE L'ACTIVITE ASPARTIQUE-DECARBOXYLASE DANS LES EXTRAITS PARTIELLEMENT PURIFIES (Stade III).

La fraction protéique précipitée par le sulfate d'ammonium entre 60 et 80 % de la saturation n'a qu'une activité aspartique-décarboxylase très faible et parfois même nulle. L'activité est restaurée, du moins dans la plupart des cas, par le phosphate de pyridoxal (Fig. 27) et on pourrait de ce fait penser que l'inactivation au cours du traitement par le sulfate d'ammonium est due à une résolution de l'apoenzyme et du coenzyme. Cette interprétation ne peut cependant pas être retenue étant donné que les α céto-acides ont le même effet que le PALP (Fig. 27).

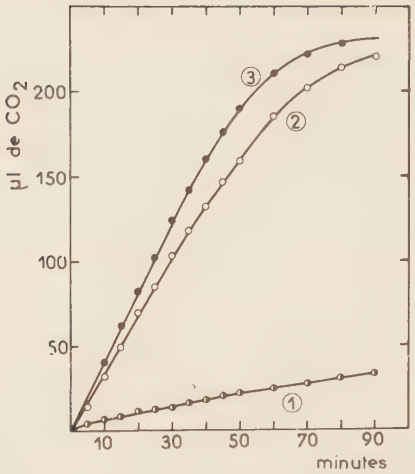


Figure 27.- Réactivation par le pyridoxal-phosphate et l'α-céto-glutarate de l'aspartique-décarboxylase contenue dans la fraction protéique 0.6 - 0,8 S. Conditions expérimentales : tampon acétate pH 5,0, 0,33 M + fraction protéique 0,6 - 0,8 S non dialysée: 0,5 ml. Courbe (1) : acide L-aspartique seul 10 µM. Courbe (2) : acide aspartique + PALP 10^{-3}M. Courbe (3) : acide aspartique + α céto-glutarate 10^{-3}M.

Ils agissent à des concentrations également très faibles, d'ordre catalytique. Dans certains cas, lorsque les préparations sont par elle-même totalement inactives, seuls les céto-acides restaurent l'activité.

Les données expérimentales rassemblées sur le tableau XII montrent que le pyridoxal non phosphorylé a un effet comparable à celui du PALP et des céto-acides mais cependant moins marqué.

Par contre la PAM phosphorylée ou non est sans effet. Ces observations suggèrent que la réactivation de l'enzyme consiste dans une réaction chimique où intervient un groupement carbonyle aldéhydique ou cétonique. On voit d'autre part que les effets du PALP et des céto-acides, lorsque ces composés sont chacun employés à la concentration optimum, ne sont pas additifs.

La figure 28 montre que l'α céto-glutarate a une action optimum à concentration environ 10^{-4}M comme le PALP. Il semble que le pyruvate soit relativement moins efficace, sa concentration optimum étant de l'ordre de 10^{-3}M. On observe d'autre part qu'à concentration 10^{-2}M, l'α céto-glutarate exerce une inhibition qui ne se produit pas avec les deux autres agents de réactivation. En présence d'α céto-glutarate, l'activité enzymatique présente un optimum à pH 4,0, tandis qu'en

TABLEAU XII

Réactivation de l'enzyme.

Extrait (Stade III) (après précipitation par $SO_4(NH_4)_2$).
Activités mesurées en tampon acétate pH 5,0, t° 37° ; phase gazeuse : air
Agents réactivants ajoutés, sauf indication contraire, à la concentration finale $3,3\ 10^{-4}$M dans les systèmes manométriques.
Activités (+ Q_{CO_2}) mesurées par hre et par ml d'extrait.

Addition	+ Q_{CO_2}	Activation
Néant	18	x 1
pyridoxal	68	x 3,8
pyridoxal-phosphate	128	x 7,1
pyridoxamine	16	x(0,9)
pyridoxamine-phosphate	23	x 1,3
α céto-glutarate	210	x 11,7
α céto-glutarate + pyridoxal-ph	210	x 11,7
α céto-glutarate(1) + pyridoxamine-ph	153	x 8,5
α céto-glutarate(2) + pyridoxamine-ph	214	x 11,9

(1) céto-acide et pyridoxamine-ph à concentrations équimoléculaires
(2) céto-acide à concentration 3 fois plus élevée (10^{-3}M) que le pyridoxamine-ph.

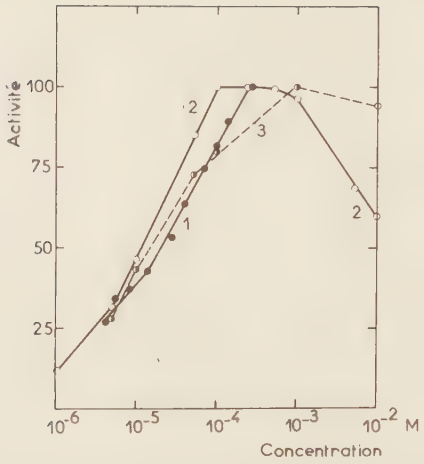


Figure 28.- Influence de la concentration en céto-acides et en pyridoxal-phosphate sur la réactivation de l'aspartique décarboxylase. Conditions expérimentales : acide aspartique 10 µM, tampon acétate pH 5,0 0,33M fraction protéique 0,6 - 0,8 S non dialysée 0,5 ml ; t° 37°. Courbe (1) ●—● acide aspartique + PALP. Courbe (2) o—o o—o acide aspartique + α céto-glutarate. Courbe (3) ·o· ·o· acide aspartique + pyruvate.

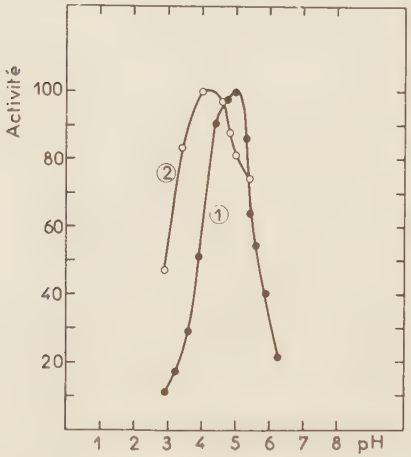


Figure 29.- Influence du pH sur la réactivation de l'aspartique-décarboxylase par l'α céto-glutarate et le pyridoxal-phosphate. Conditions expérimentales : acide aspartique 10 µM, fraction protéique 0,6 - 0,8 S non dialysée 0,5 ml. Courbe (1) acide aspartique + PALP 10^{-3}M; Courbe (2) acide aspartique + α céto-glutarate 10^{-3}M. Les activités sont exprimées en pour cent de l'activité maximum.

présence de PALP cet optimum est situé à pH 5 (Fig. 29). Cette différence de comportement peut correspondre à des mécanismes d'activation différents.

D'autre part, nous avons constaté que si on dialyse les préparations enzymatiques jusqu'à élimination complète du sulfate d'ammonium, leur activité augmente avec le temps de dialyse. Après 3 heures, elle est égale à l'activité de l'extrait non dialysé en présence de pyridoxal-phosphate et n'est alors plus augmentée par l'addition de céto-acide ou de PALP (Tableau XIII).

TABLEAU XIII

Activation par dialyse de la fraction protéique 0,6 - 0,8 s.

Durée de dialyse	Q_{CO_2}/hre/ml	
	Extrait seul	Extrait + α céto-glutarate + pyridoxal-phosphate
30 minutes	142	580
60	216	500
90	264	464
120	308	500
150	420	436
180	364	332

Systèmes : extrait purifié (Stade III) ; L-aspartate 3,3 10^{-3}M ; tampon acétate 0,33 M , pH 5,0 ; ± α céto-glutarate 10^{-3}M et pyridoxal-phosphate 65 µg (0,8 10^{-4}M).

Le fait qu'une dialyse prolongée n'inhibe pas les préparations enzymatiques, mais au contraire les réactive, confirme l'interprétation suivant laquelle le sulfate d'ammonium ne détermine pas une résolution de l'enzyme, mais convertit celui-ci en une forme inactive. On a constaté à ce sujet que les préparations totalement réactivées par dialyse

sont à nouveau inactivées par l'addition de sulfate d'ammonium, et protégées contre cet effet par les céto-acides ou, à un moindre degré, par le PALP (Tableau XIV).

TABLEAU XIV

Inhibition de la 4 aspartique-décarboxylase par $SO_4(NH_4)_2$

Expérience effectuée sur un extrait partiellement purifié (Stade III)

	$+ Q_{CO_2}$		
	sans addition	+ céto-glutarate (10^{-3}M)	+ pyridoxal-phosphate (200 µg/ml) $0{,}77.10^{-3}$M
Extrait non dialysé	82	690	220
Extrait dialysé (4 h)	436	436	404
idº + $(NH_4)_2SO_4$ 0.001 M	320	448	368
" " 0.01 M	172	460	292
" " 0.1 M	32	448	112

On a d'abord pensé que le sulfate d'ammonium inhibe l'activité en formant avec le coenzyme un dérivé aminé-inactif. Tel n'est cependant pas le cas. En effet, nous avons constaté (Tableau XV) que l'inhibition n'est pas due à l'ion ammonium mais à l'ion sulfate. Parmi les autres anions essayés, le nitrate a un effet semblable à celui du sulfate, alors que le chlorure est sans action.

TABLEAU XV

Inhibition de la 4-aspartique décarboxylase par différents sels.

Addition		Inhibition %
$SO_4(NH_4)_2$	0,1 M	81
$ClNH_4$	0,2 M	14,8
NO_3NH_4	0,2 M	83,5
SO_4Na_2	0,1 M	87,0
NO_3Na	0,1 M	77,0

Forme du coenzyme dans les préparations traitées par le sulfate d'ammonium.

Afin de préciser davantage l'action du sulfate d'ammonium sur la 4 aspartique-décarboxylase, on a réalisé une série d'expériences dans lesquelles la teneur des préparations enzymatiques en PALP a été estimée par la méthode de la tyrosine apo-décarboxylase (Chapitre II).

Les extraits, préalablement bouillis pendant 5 min. dans la soude 0,1 N de façon à libérer le coenzyme, puis neutralisés, ont été ajoutés à des cellules de Streptococcus faecalis cultivées sur milieu déficient en vitamine B_6, suivant les conditions décrites par Gunsalus et Smith (48), et on a mesuré la vitesse de décarboxylation de la L tyrosine (Tableau XVI). On voit que les préparations obtenues à partir d'extraits traités par SO_4Am_2 et non dialysés, n'ont aucun effet sur l'activité tyrosine-décarboxylase. Par contre, ces mêmes préparations additionnées d'α céto-glutarate, ou les préparations obtenues après traitement par la soude d'extraits préalablement dialysés contiennent du PALP libre, comme le démontre l'accroissement considérable de + Q_{CO_2}.

Ces résultats fournissent une preuve complémentaire de ce que le traitement par le sulfate d'ammonium a pour effet de placer le coenzyme de la 4 aspartique_décarboxylase sous une forme inactive, reversiblement reconvertie en PALP soit par dialyse prolongée soit par les α céto-acides.

TABLEAU XVI

Activation de la tyrosine apodécarboxylase par les fractions protéiques 0,6 - 0,8 S

	Q_{CO_2} / 15 min.
Apoenzyme S. faecalis seul	28
+ PALP	97
+ PAMP	20
+ α céto-glutarate	28
+ PAMP + α céto-glutarate	123
+ extrait (stade III) non dialysé	28
+ extrait (stade III) dialysé 5 h.	78
+ extrait (stade III) non dialysé + α céto-glutarate	86

Conditions expérimentales : tyrosine : 5.10^{-3}M ; ± PALP $1,25.10^{-4}$M ; ± PAMP $1,17.10^{-4}$M ; ± α céto-glutarate (10^{-3}M) ; tampon acétate pH 5,5.

CHAPITRE V

CONVERSION REVERSIBLE, PAR TRANSAMINATION NON ENZYMATIQUE, DU PYRIDOXAMINE-PHOSPHATE (PAMP) EN PYRIDOXAL-PHOSPHATE (PALP)

I. TRANSAMINATION EN PRESENCE D'EXTRAIT ENZYMATIQUE.

Les expériences précédentes semblent donc montrer qu'une forme inactive du coenzyme est transformée en PALP en présence de céto-acide. Meister (87) a émis l'hypothèse que l'activation par les céto-acides pouvait être due à une transamination enzymatique transformant la PAMP en PALP.

C'est pourquoi, nous avons essayé de savoir si nos extraits étaient capables d'effectuer la réaction :

Pyridoxamine-phosphate + céto-acide → pyridoxal-phosphate + amino-acide.

Cette étude a été effectuée à pH 5,0 et à + 37°, en présence d'un excès d'α céto-glutarate, la réaction étant suivie par l'accroissement de la densité optique à 388 mμ, longueur d'onde qui correspond spécifiquement à l'absorption du coenzyme sous sa forme aldéhydique.

Nous avons observé :

1°) que les extraits convertissent le phosphate de pyridoxamine en phosphate de pyridoxal.

2°) que cette réaction demande la présence simultanée d'un céto-acide et de l'extrait bactérien.

3°) que la vitesse de réaction est proportionnelle à la quantité d'extrait.

4°) qu'il y a formation d'acide glutamique.

Nous avons d'abord pensé que cette transformation du pyridoxamine-phosphate était dûe à un enzyme spécifique analogue à la pyridoxamine-phosphate transaminase observée par Beechey et Happold dans les extraits d'E. coli (9). Mais nous avons constaté que la réaction est également catalysée par les extraits préalablement bouillis, ce qui exclue un processus enzymatique et montre qu'il s'agit en réalité d'une simple réaction chimique catalysée par une substance contenue dans l'extrait.

Nous avons alors observé que l'extrait bouilli peut être remplacé par les ions métalliques Fe^{++}, Fe^{+++}, Cu^{++}, tandis que Zn^{++} et Mg^{++} sont inactifs (20 c).

II. TRANSAMINATIONS CHIMIQUES DU PHOSPHATE DE PYRIDOXAMINE ET DU PHOSPHATE DE PYRIDOXAL.

A) METHODES EXPERIMENTALES.

1) Systèmes

Cette étude a été effectuée dans les conditions où la 4 aspartique-décarboxylase est physiologiquement active, c'est-à-dire à pH 5,0 et à + 37°. Les systèmes employés contenaient soit du PALP et un amino-acide, soit du PAMP et un céto-acide. On a d'autre part fait varier les conditions en employant des systèmes où les réactifs se trouvaient initialement en concentrations équimoléculaires et des systèmes contenant 100 fois plus d'amino-acides ou d'α céto-acides que de PALP ou de PAMP.

La concentration en ions cuivre ajoutés sous forme de SO_4Cu était égale à 2.10^{-4}M dans tous les systèmes. Les amino-acides et les céto-acides employés sont l'α alanine, l'acide glutamique, l'α céto-glutarate et le pyruvate.

2) Méthodes spectrophotométriques.

Les spectres d'absorption des mélanges réactionnels ont été relevés avec un spectrophotomètre Jobin et Yvon dans des cuves en quartz de 1 cm.

En tampon acétate pH 5,0, 0,1 M, le spectre du PALP présente deux pics d'absorption : un à 330 mμ (ε_M = 2650) et l'autre, caractéristique de la fonction aldéhydique, à 388 mμ (ε_M= 5200) (Fig. 30). Le phosphate de pyridoxamine a un seul maximum d'absorption à 325 mμ (ε_M = 10200) et n'absorbe pas dans la partie du spectre situé entre 350 et 460 mμ (Fig. 35).

Le spectre de la lumière émise par fluorescence a été enregistré perpendiculairement à un faisceau de lumière de Wood, par un monochromateur muni d'une chambre photographique et les intensités, relevées sur les clichés avec un microphotomètre enregistreur, ont été ramenées à une échelle linéaire en longueur d'onde.

3) Chromatographie sur papier.

Les mélanges réactionnels ont été chromatographiés sur papier Whatman n° 1 (méthode descendante) en phase butanol tertiaire-acide formique à 99 % - eau (70 : 15 : 15). Après séchage, les chromatogrammes étaient examinés à la lumière ultra-violette et révélés à la ninhydrine.

B) ETUDES CINETIQUES.

1) Réactions entre PALP et amino-acides en l'absence de métaux.

Comme nous l'avons vu dans l'exposé bibliographique, Metzler (93) a étudié la formation, en l'absence d'ions métalliques de bases de Schiff entre le PAL et les amino-acides. Ces imines ont un spectre d'absorption caractérisé par un maximum situé à 414 mμ et par un autre moins accusé à 280 mμ. A pH 7,4, elles se forment en quantité notable lorsque le rapport des concentrations de l'amino-acide et du PAL est compris entre 10^4 et 10^3.

Des observations semblables ont été faites par Matsuo (79) sur les dérivés phosphorylés. Cet auteur a observé la formation en solution aqueuse neutre de bases de Schiff entre le PALP et les amino-acides.

En nous plaçant dans les conditions décrites par ces auteurs nous avons obtenu des résultats entièrement concordants avec les leurs, c'est-à-dire la formation des bases de Schiff dont le maximum d'absorption est déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport à celui

du PAL et du PALP. Nous avons vérifié, d'autre part, que si le rapport [AA] / [PALP] est abaissé à 100 : 1, la formation des bases de Schiff à pH 7,5 se traduit seulement par un déplacement lent et progressif du pic du PALP vers les grandes longueurs d'onde et sa stabilisation, au bout de 4 h environ, à 395 mμ. A pH 5,0, la modification du spectre est encore plus lente et moins marquée. Enfin, lorsque le rapport [AA] / [PALP] est équimoléculaire, on ne constate pratiquement aucune modification d'amplitude ni déplacement du pic d'absorption du PALP, qui demeure fixe à 388 mμ.

2) Systèmes PALP-amino-acide-cuivre

L'addition de cuivre dans les systèmes où le rapport [AA] / [PALP] est compris entre 100 : 1 et 1 : 1, entraîne des modifications spectrales extrêmement accusées, qui correspondent à la formation de complexes intermédiaires et, dans certaines conditions, à la formation de PAMP libre, par transamination. Ces réactions ont été étudiées à pH 5,0 (tampon acétate 0.1 M), en présence d'une concentration fixe de $CuSO_4$ (2.10^{-4}M). La concentration de PALP, comprise entre 3 et 4.10^{-4}M, était déterminée exactement d'après le coefficient moléculaire d'absorption de ce composé à 388 mμ et à pH 5.0 (ε_M = 5.200). L'amino-acide (L-α-alanine ou L-glutamate) était ensuite ajouté à concentration égale ou 100 fois supérieure à celle du PALP. Les mélanges réactionnels étaient incubés à + 37° et leurs spectres relevés à intervalles de temps, entre 260 et 460 mμ, en prenant comme blanc un mélange témoin contenant tous les réactifs sauf le PALP.

Dans le cas des mélanges équimoléculaires d'alanine et de PALP, on constate (Fig. 30. A) un déplacement progressif du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'onde, et sa stabilisation, au bout de 24 h environ, à 357-360 mμ. Le nouveau pic ne présente pas d'inflexion vers 325 mμ, ce qui indique qu'il ne s'est pas formé de PAMP. Il correspond à un mélange de PALP restant et d'un complexe intermédiaire, qui a été isolé chromatographiquement comme il sera précisé plus loin.

L'absorption du complexe isolé est maximum à 355 mμ et négligeable à 410 mμ, tandis qu'à cette dernière longueur d'onde celle du PALP représente 63,8 % de son maximum. On peut ainsi calculer que la concentration restante du PALP dans le mélange considéré représente 19,5 % de sa con-

centration initiale. Comme tout le PALP disparu est engagé dans le complexe, il est également possible, en soustrayant de la densité optique à 355 mμ l'absorption, à cette longueur d'onde, du PALP restant, de déterminer l'absorption propre du complexe et son coefficient moléculaire.

Lorsque la concentration initiale de l'alanine est 100 fois supérieure à celle du PALP (Fig. 30. B), le spectre relevé après incubation montre la présence simultanée de PALP, de complexe et de PAMP libre, formé par transamination. Le pic qui culmine vers 380 mμ et dont l'amplitude décroît en cours d'incubation correspond au mélange du complexe et du PALP restant. La concentration du PALP et l'absorption à 355 mμ due au complexe peuvent être calculées comme il vient d'être dit, même en présence de PAMP, dont l'absorption à 355 mμ est nulle. La formation de PAMP libre s'exprime par l'apparition progressive d'un nouveau pic à 325 mμ et peut être déterminée quantitativement d'après le coefficient moléculaire du PAMP à pH 5,0 ($\varepsilon_M^{325\ m\mu} = 10.200$), après soustraction des absorptions du complexe et du PALP restant à cette longueur d'onde. Par différence, on obtient la concentration du complexe dont on peut ainsi calculer le coefficient moléculaire d'absorption. Les résultats de ces calculs montrent (Tableau XVII) que la transamination est déjà

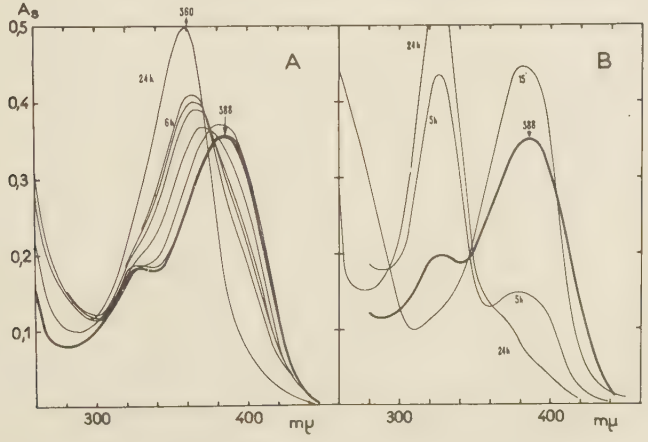


Figure 30.- Spectres d'absorption des mélanges L-α-alanine-PALP-Cu^{++} (pH 5,0 ; température, 37°). (A) Alanine et PALP à concentrations équimoléculaires ($2.7.10^{-4}$M) ; (B) alanine 100 fois plus concentrée. Les spectres initiaux sont tracés en trait plus épais.

TABLEAU XVII

Composition des mélanges réactionnels après incubation à pH 5,0

Mélanges		Temps de réaction (h)	PALP (%)	PAMP (%)	Complexe (%)	ε_M du complexe
			restant	formé		
Alanine-PALP	1 : 1	5	66	0	34	8.987
	1 : 1	24	19,5	0	80,5	4.000
	100 : 1	5	20	42,8	37	2.644
	100 : 1	24	6,8	55,9	37,3	4.241
Glutamate-PALP	1 : 1	5	92,6	6,2	1,1	-
	1 : 1	24	68	9,4	22,6	2.681
	100 : 1	5	53	24,3	22,5	2.600
	100 : 1	24	11,7	59,8	28,5	1.893
			formé	restant		
Pyruvate-PAMP	1 : 1	4,5	7,3	41,6	46,9	9.560
	100 : 1	5	88,8	0	11,2	9.750
α-cétoglutarate-PAMP	1 : 1	4,5	20,6	70	8,4	9.621
	100 : 1	5	88,9	7	4	10.500

importante au bout de 5 h et qu'en fin d'expérience la quantité de PAMP libre formée représente environ 50 % du PALP initial. Ils montrent, d'autre part, que la concentration relative du complexe demeure sensiblement constante pendant toute la réaction et représente environ 37 % du PALP initial.

Dans les mélanges où l'alanine est remplacée par l'acide L-glutamique, on relève des modifications spectrales comparables (Fig. 31. A et B).

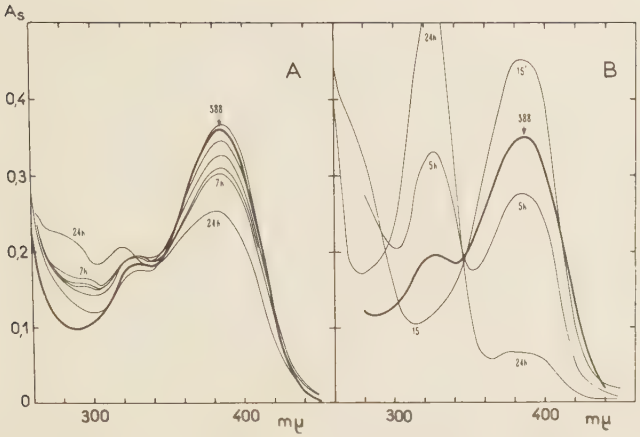


Figure 31.- Spectres d'absorption des mélanges acide L-glutamique-PALP-Cu^{++} (pH 5,0 ; température, 37°). (A) acide glutamique et PALP à concentrations équimoléculaires ; (B) acide glutamique 100 fois plus concentré. Les spectres initiaux sont tracés en trait plus épais.

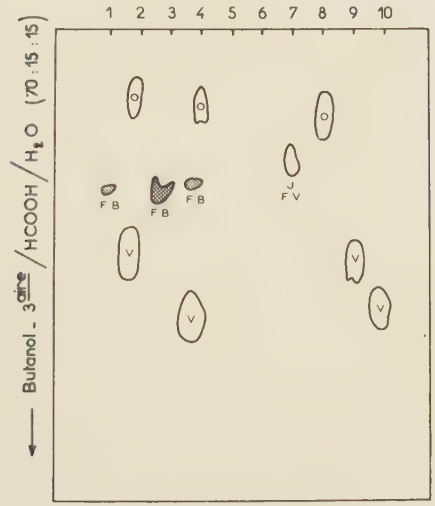


Figure 32.- Chromatographie sur papier des mélanges d'amino-acides et de PALP. Systèmes réactionnels : (1) acide L-glutamique-PALP 1 : 1 ; (2) acide L-glutamique-PALP 100 : 1 ; (3) L-α-alanine-PALP 1:1 ; (4) L-α-alanine-PALP 100 : 1 ; témoins : (5) α-céto-glutarate ; (6) PALP à la même concentration que dans les mélanges réactionnels ; (7) PALP 10 fois plus concentré ; (8) PAMP ; (9) acide L-glutamique ; (10) L-α-alanine. J : coloration jaune ; F.B. : fluorescence bleue ; F.V. : fluorescence verte ; coloration après révélation par la ninhydrine : O : orange ; V : violet.

Avec cet amino_acide le complexe se forme toutefois plus lentement et est moins stable, ce qui se traduit par une transamination moins complète et par une moindre accumulation du complexe intermédiaire en cours de réaction (Tableau XVII). Il convient d'autre part de souligner que les déterminations quantitatives du complexe PALP-glutamate-Cu^{++} figurant sur le tableau, ont été calculées d'après le coefficient d'absorption spécifique du complexe PALP-alanine-Cu^{++} qui a seul pu être isolé. De ce fait, ces estimations n'ont qu'une valeur relative. Les mêmes remarques s'appliquent d'ailleurs au cas, dont il sera fait mention plus loin, des complexes formés entre PAMP et α-céto-glutarate.

La chromatographie sur papier des mélanges réactionnels (Fig. 32) confirme la formation de PAMP libre dans les mélanges [AA] / [PALP] 100 : 1. Elle montre en outre la présence dans tous les systèmes de complexes intermédiaires qui se manifestent par une tache fluorescente à l'u.v. (R_F, 0,35), nettement séparée des taches du PAMP (R_F, 0,16) et du PALP (R_F, 0,29). La fluorescence des complexes a une teinte bleue très différente de la fluorescence verte du PALP. A la concentration où ce dernier se trouve dans les mélanges réactionnels, sa fluorescence est d'ailleurs trop faible pour être détectée sur les chromatogrammes. Les complexes ne se colorent pas par la ninhydrine, ce qui indique que la fonction α-aminée de l'amino_acide participe à la liaison chimique avec le PALP.

Le complexe alanine-cuivre-PALP a été isolé par élution sélective des chromatogrammes. Son spectre d'absorption (Fig. 33) est identique à celui du complexe formé dans la réaction inverse, c'est-à-dire dans les mélanges de pyruvate, de cuivre et de PAMP, et comporte un pic unique et symétrique, culminant à 355 mμ. La composition spectrale de la lumière émise par fluorescence est représentée sur la Fig. 34.

A pH 7,5, le cuivre catalyse également la formation de complexes, mais ceux-ci sont beaucoup plus stables qu'à pH 5,0 et on ne constate pas de transamination, même dans les mélanges où les rapports [AA] / [PALP] sont de 100 : 1. On ne constate pas, en effet, l'apparition du pic caractéristique du PAMP libre, à 325 mμ, mais seulement un déplacement du pic du PALP vers les courtes longueurs d'onde et l'effacement de son inflexion à 350 mμ. Ces modifications sont semblables à celles que Matsuo (79) a relevé à pH neutre et en présence de métaux.

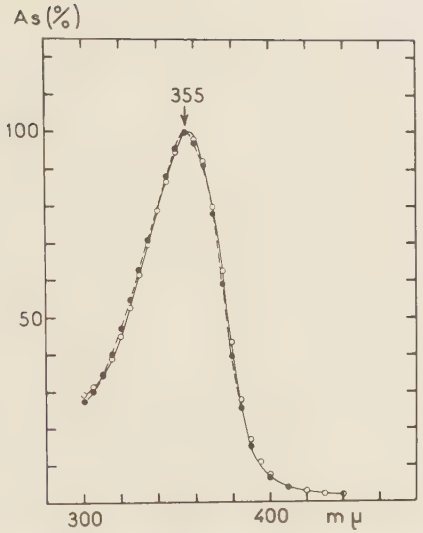


Figure 33.- Spectres d'absorption des complexes isolés par élution des chromatogrammes. ——— : complexe formé dans un mélange équimoléculaire de pyruvate et de PAMP ; ----- : complexe formé dans un mélange équimoléculaire d'α-alanine et de PALP.

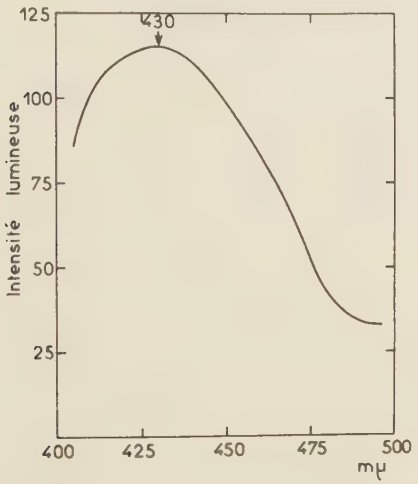


Figure 34.- Spectre de la lumière émise par fluorescence (complexe formé en présence de cuivre dans un mélange équimoléculaire de pyruvate et de PAMP, et séparé par chromatographie). Les intensités lumineuses sont exprimées en unités arbitraires.

3) Réactions entre PAMP et céto-acides en présence de cuivre.

Les réactions inverses, entre PAMP et céto-acides (pyruvate et α-céto-glutarate) ont été étudiées dans des conditions analogues, c'est-à-dire à + 37° et à pH 5,0, en présence de $CuSO_4$ 2.10^{-4}M. Les concentrations initiales du PAMP étaient comprises entre 3 et 4.10^{-4}M et déterminées d'après le coefficient moléculaire d'absorption de ce composé à pH 5,0 ($\varepsilon_M^{325m\mu}$ = 10.200).

Dans les mélanges [CA] / [PAMP] 1 : 1, on constate (Fig. 35) la diminution progressive du pic du PAMP, tandis que l'absorption augmente au voisinage de 360 mμ, dans le cas du pyruvate, et de 385 mμ dans le cas de l'α-céto-glutarate. La composition des mélanges après 4,5 h d'incubation est rapportée sur le Tableau XVII. On voit que, dans le cas du pyruvate, les concentrations du PAMP restant et du complexe formé sont sensiblement égales et que la quantité de PALP libre, formée par transamination, est très faible, ne dépassant pas 7 % du PAMP initial. Dans le cas de l'α-céto-glutarate, la quantité de PAMP disparue est moindre (30 %) et le mélange contient relativement peu de complexe mais, par contre, des quantités déjà élevées de PALP libre.

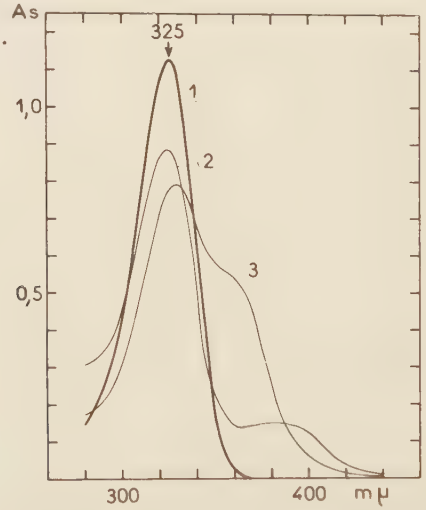


Figure 35.- Spectres d'absorption des mélanges équimoléculaires de céto-acides et de PAMP ($4,4.10^{-4}$M) (pH 5,0 ; température 37° ; temps de réaction : 4,5 h). (1) spectre initial du PAMP ; (2) système contenant l'α-céto-glutarate ; (3) système contenant le pyruvate.

Lorsque le rapport des concentrations [CA] / [PAMP] est de 100 : 1 (Fig. 36. A et B), on observe au bout de 5 h la disparition pratiquement complète du PAMP. La quantité de PALP libre, formé par transamination, est sensiblement la même avec les deux céto-acides, mais dans le cas du pyruvate la concentration finale du complexe est un peu plus élevée, ce qui se traduit par le déplacement du pic du PALP vers 380 mμ.

Ces observations montrent qu'en présence de cuivre et à pH 5,0, les transaminations non-enzymatiques sont plus rapides et plus complètes dans le sens PAMP ⟶ PALP que dans le sens inverse. Elles confirment , d'autre part, que les complexes métalliques formés sont plus stables avec le pyruvate ou l'alanine qu'avec l'α-céto-glutarate ou l'acide glutamique.

Les chromatogrammes des systèmes PAMP-CA (Fig. 37) montrent que les complexes intermédiaires ont la même mobilité que ceux formés dans les mélanges PALP-AA.

Coefficients d'absorption moléculaire des complexes

Les coefficients moléculaires d'absorption des complexes ont été déterminés, par la méthode indiquée, dans tous les mélanges réactionnels. On constate (Tableau XVII) que leurs valeurs numériques présentent des variations considérables et que, d'une manière générale, elles sont beaucoup plus élevées dans les mélanges où la transamination est quantitativement importante et s'opère dans le sens PAMP ⟶ PALP que dans le sens inverse, ou lorsque se forme un complexe sans transamination concomitante. La signification de ces faits sera discutée plus loin.

III. DISCUSSION

Nos observations apportent des données nouvelles sur les transaminations non-enzymatiques des dérivés phosphorylés de la vitamine B_6. Elles montrent, en particulier, qu'en présence de Cu^{++} et d'autres métaux, ces transaminations s'effectuent non seulement à + 100°, comme l'ont constaté Metzler et Snell (91), mais encore à des températures physiologiques, et qu'à pH 5,0 elles atteignent des rendements élevés, même lorsque les rapports initiaux de concentrations [AA] /[PALP] et [CA] / [PAMP] sont faibles. D'autre part, elles confirment et complètent les observations

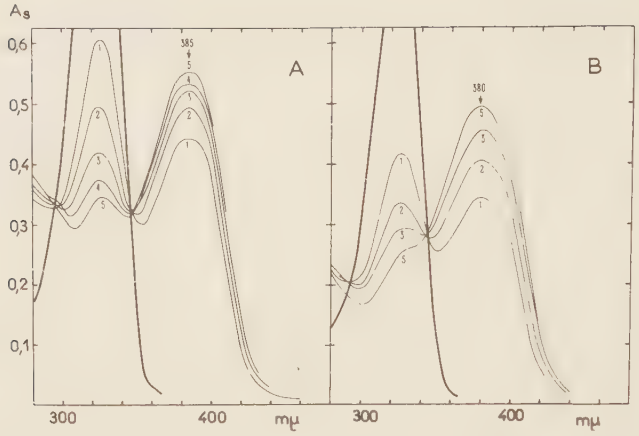


Figure 36.- Spectres d'absorption des mélanges contenant une concentration initiale en céto-acides 100 fois supérieure à la concentration en PAMP (pH 5,0, température, 37°). (A) α-céto-glutarate-PAMP ; (B) pyruvate-PAMP. Spectres relevés à intervalles d'une heure.

Figure 37.- Chromatographie sur papier des mélanges de céto-acides et de PAMP. Systèmes réactionnels : (1) α-céto-glutarate-PAMP 1 : 1 ; (2) α céto-glutarate-PAMP 100 : 1 ; (3) pyruvate-PAMP 1 : 1 ; (4) pyruvate-PAMP 100 : 1 ; Témoins : (5) PALP concentré ; (6) α-céto-glutarate ; (7) pyruvate ; (8) L-α-alanine ; (9) acide L-glutamique ; (10) PAMP. J : coloration jaune ; F.B. : fluorescence bleue ; F.V. : fluorescence verte ; coloration après révélation par la ninhydrine : O : orange ; V : violet.

antérieures sur la formation intermédiaire de complexes dans ces réactions, qui peuvent être représentées par le schéma général :

$$\text{PALP} + \text{amino-acide} + Cu^{++} \rightleftharpoons \text{complexe} \rightleftharpoons \text{PAMP} + \text{céto-acide} + Cu^{++}$$

Fasella et coll.(37) ont étudié les complexes formés à 100° et à pH 7,0 entre le PALP, les amino-acides et les métaux et les ont séparés chromatographiquement. Ils ont constaté que ces complexes, comme ceux que nous avons obtenus, ont une forte fluorescence bleue et ne se colorent pas par la ninhydrine, ce qui indique que leur structure comporte une liaison imine dans laquelle le groupement $-NH_2$ de l'amino-acide est engagé. Cependant, ces auteurs ont constaté au lieu d'un complexe unique deux composés ayant des mobilités chromatographiques différentes et ont relevé, pour celui de ces composés dont ils ont pu étudier le spectre, un maximum d'absorption situé vers 330 mμ. Ces divergences avec nos résultats s'expliquent vraisemblablement par le fait qu'à + 100°, il se produit une hydrolyse partielle du PAMP, du PALP et des complexes eux-mêmes.

Les bases de Schiff formées par Metzler (93) et par Matsuo (79) avec le PAL ou le PALP et les amino acides en l'absence de métaux et à température ordinaire présentent, à pH neutre ou acide, deux maximums d'absorption situés à 280 et 414 mμ. D'après Metzler ce dernier maximum, fortement déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au pic du PAL et du PALP, est dû à une liaison hydrogène entre le groupement 3-hydroxyle du PAL et l'atome d'azote de la base de Schiff. Une première preuve à l'appui de cette interprétation est que les salicyl-aldimines présentent également un maximum d'absorption à 410 mμ, mais que la méthylation de la fonction phénolique ramène à 370 mμ le spectre des imines correspondantes. Un autre argument est qu'en milieu très alcalin, où l'hydroxyle du PAL est fortement ionisé et ne peut contracter une liaison hydrogène, les bases de Schiff ont un maximum d'absorption unique et situé non plus à 414 mμ mais à 360 mμ.

Ces considérations conduisent à attribuer aux complexes que nous avons obtenus, et dont le maximum d'absorption est situé à 355 mμ, la configuration proposée par Longenecker et Snell (73) et par Christensen (22), c'est-à-dire une structure dans laquelle le cuivre est combiné

avec les deux hydroxyles du noyau pyridine et de l'amino_acide, ce qui a pour effet d'empêcher l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle de la pyridine et l'azote de l'imine. Les deux formes tautomères aldimine (I) et cétimine (II) d'un tel complexe et l'ordre de leurs interconversions au cours des transaminations sont représentées sur la Fig. 38.

En règle générale, la condition structurale nécessaire pour que les dérivés de la vitamine B_6 aient un maximum d'absorption situé entre 330 et 390 mμ est l'existence de deux doubles liaisons conjuguées, l'une sur le carbone substitué en position 4 et l'autre sur le cycle pyridine (92). En ce qui concerne les complexes, cette condition n'est réalisée que par la structure aldimine et, de ce fait, il est probable que l'absorption à 355 mμ est exclusivement due à cette forme. Dans le cadre de cette hypothèse, les coefficients moléculaires d'absorption qui ont été déterminés expérimentalement (Tableau XVII) dépendent de l'équilibre entre les deux formes tautomères des complexes et de leurs concentrations relatives, ce qui explique leurs variations suivant les conditions expérimentales.

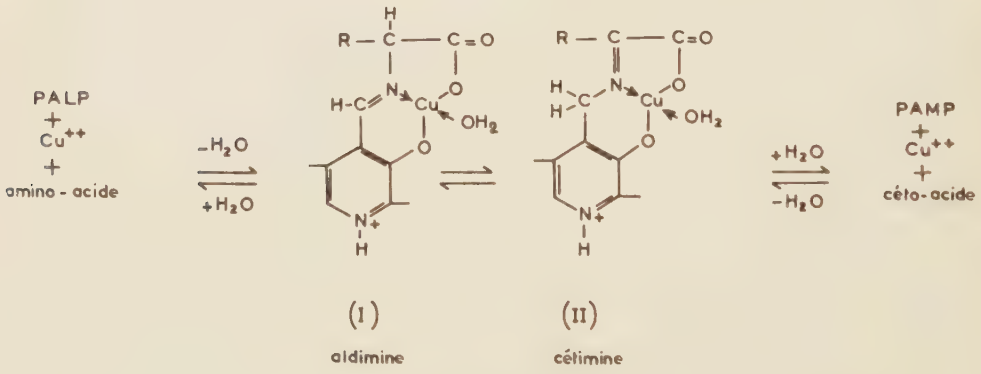


Figure 38.- Structure des complexes intermédiaires. Pour la clarté de la figure, on a omis de représenter sur le cycle pyridine les substituants 2-méthyle et 5-hydroxy-méthyle phosphate.

On doit s'attendre à ce que la forme prédominante du complexe soit, dans un mélange donné, celle qui précède immédiatement les produits finaux de la réaction. Les faits observés concordent avec cette prévision. Ils montrent, en effet, que le coefficient moléculaire d'absorption, et corrélativement la proportion relative de la forme aldimine, sont plus élevés lorsque la transamination s'effectue dans le sens PAMP $\rightarrow$ PALP que dans le sens inverse.

Les complexes isolés chromatographiquement à partir des mélanges réactionnels où les concentrations initiales des réactifs sont équimoléculaires ont exactement le même spectre d'absorption (Fig. 33), qu'il s'agisse des systèmes amino-acide-PALP ou des systèmes céto-acide-PAMP. Cette observation montre que, comme dans le cas des dérivés non-phosphorylés de la vitamine B_6 (31), la forme stable des complexes est la structure aldimine. La plus grande stabilité de cette dernière forme concorde également avec le fait que le coefficient d'absorption du complexe est relativement élevé dans les mélanges équimoléculaires d'alanine et de PALP, mélange où le complexe se forme en l'absence de toute transamination.

CHAPITRE VI

CHROMATOGRAPHIE SUR ÉCHANGEURS D'IONS DE LA 4-ASPARTIQUE DÉCARBOXYLASE

I. INTRODUCTION

La chromatographie d'adsorption sur gel de brushite (cf chapitre IV) ne permet pas de purifier l'enzyme dans des conditions satisfaisantes pour entreprendre une étude sur la structure et les propriétés de 4-aspartique_décarboxylase pure. En effet, cette technique présente deux inconvénients majeurs. D'une part, les expériences de purification sur brushite ne sont pas toujours reproductibles et d'autre part, la capacité des gels est très faible et ne permet pas de chromatographier plus de 15 mg de protéines totales sur les colonnes employées.

Pour ces raisons, nous avons essayé d'étudier le comportement de notre enzyme sur les échangeurs d'ions à base de cellulose. Cette chromatographie a été mise au point par Peterson et Sober (97) qui ont employé la cellulose comme support pour la fixation de radicaux acides ou basiques. Ces auteurs ont ainsi préparé, par introduction de groupes ionisables dans la cellulose, plusieurs dérivés qui présentent une grande surface active. Ces adsorbants ont une stabilité physique et chimique plus grande que les autres résines et possèdent également une capacité relativement plus élevée pour les protéines. L'incorporation des groupements ionisables a été limitée à 1 milliéquivalent par gramme d'adsorbant. Au dessus de cette valeur, les propriétés physiques des dérivés cellulosiques se modifient de telle manière que ceux-ci peuvent devenir solubles ou gélatineux.

Les échangeurs d'anions les plus couramment utilisés sont la diéthylaminoéthylcellulose (DEAE), la triéthylaminoéthylcellulose (TEAE) et un produit complexe (ECTEOLA) résultant de la réaction de la triéthanolamine et de l'épichlorhydrine avec la cellulose. Les échangeurs de cations sont principalement la carboxy-méthylcellulose (CM), la phosphocellulose (P),

la sulfoéthylcellulose (SE) et la sulfométhylcellulose (SM).

La carboxyméthylcellulose, préparée par réaction de l'acide chloroacétique sur la cellulose, contient des groupements carboxyméthyl ($-CH_2 - COOH$) fixés par des liaisons éther. Le produit obtenu est un acide faible qui présente une très grande capacité. En effet, certains auteurs ont observé que la CM-cellulose peut absorber son propre poids de carboxyhémoglobine (97) ou de ribonucléase pancréatique (120).

Les dérivés cellulosiques peuvent être utilisés soit pour séparer les constituants d'un mélange de protéines, soit pour purifier une protéine particulière. C'est ainsi, par exemple, que Sober et Peterson (118) ont réussi à séparer les protéines du sérum par chromatographie sur DEAE-cellulose, et que Rhodes, Azari et Feeney (102) ont séparé les protéines du blanc d'oeuf par chromatographie sur CM-cellulose.

Le pouvoir de séparation de ces composés cellulosiques est supérieur à celui des autres résines. La CM-cellulose permet, par exemple, de fractionner la ribonucléase pancréatique en 4 composés actifs (Taborsky (120) Aqvist et Anfinsen (3)) alors que la chromatographie de cette ribonucléase sur amberlite XE64 ne sépare que deux composés.

II. ESSAIS PRELIMINAIRES D'ADSORPTION DE LA DECARBOXYLASE SUR DEAE ET SUR CM-CELLULOSE EN FONCTION DU pH.

La chromatographie des protéines sur les échangeurs d'ions devrait permettre de déterminer le caractère anionique ou cationique d'une protéine inconnue. En effet, lorsqu'on fait varier le pH, le nombre de charges de l'adsorbant et des protéines se modifie et l'étude de l'adsorption d'une protéine donnée en fonction du pH peut permettre de connaître son point isoélectrique. C'est ainsi, par exemple, que dans le cas de la lipase pancréatique, Marchis et coll. (76) ont trouvé que la courbe d'adsorption sur CM-cellulose de cet enzyme présente un point d'inflexion situé très près du point isoélectrique de la lipase. Cette détermination ne donne dans bien des cas que des indications très approximatives car l'adsorption est souvent due non seulement à l'échange d'ions mais aussi à des forces non électrostatiques.

La figure 39 montre l'adsorption de l'aspartique-décarboxylase sur CM-cellulose à différents pH. Ces expériences ont été réalisées en mettant à équilibrer 300 mg de CM-cellulose à différents pH dans des tubes de centrifugeuse. Les suspensions étaient ensuite additionnées de 1 ml de la

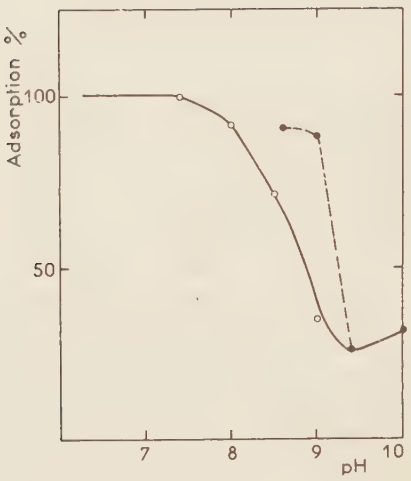


Figure 39.- Adsorption de l'aspartique-décarboxylase par la carboxyméthyl-cellulose à différents pH. Tampon tris 0,01 M ○-. Tampon glycine-NaOH 0,01 M ●-.

solution de protéines obtenue au stade III de la purification. Ces préparations contenaient 4,0 mg de protéines par ml et leur activité spécifique (Q_{CO_2} par mg de protéines) était de 336. Après avoir amené le volume total de chaque suspension à 5 ml avec le tampon approprié, on agite et on laisse l'enzyme en contact avec l'adsorbant pendant 30 minutes. Après centrifugation, on dose l'activité et les protéines dans les surnageants. Le point isolectrique trouvé par cette méthode est situé au voisinage de pH 8,8 en tampon tris 0,01 M, et de pH 9,2 en tampon glycine-NaOH.

Les expériences d'adsorption sur DEAE-cellulose ont montré que l'enzyme est complètement adsorbé à des pH supérieurs à 6,5 : lorsqu'on abaisse le pH, l'absorption est encore de 84 % à pH 6,0 et 63 % à pH 5,8. Ces résultats semblent indiquer que sur la DEAE-cellulose l'adsorption n'est pas seulement liée à l'échange d'ions.

III. ESSAIS DE PURIFICATION DE L'ASPARTIQUE-DECARBOXYLASE SUR CM-CELLULOSE.

Des expériences préliminaires ayant montré que l'enzyme est moins facilement élué de la DEAE-cellulose que de la CM-cellulose, nous avons choisi cette dernière pour effectuer la purification. En effet, l'élution de la décarboxylase adsorbée sur CM-cellulose à pH 6,5 0,01M a un rendement de 75 % avec un tampon 0,12 M tandis que 50 % seulement de l'enzyme sont élués de la DEAE-cellulose dans les mêmes conditions. Malheureusement, nous verrons que lorsqu'on essaie d'améliorer la purification, le rendement diminue beaucoup. Notre but étant d'obtenir l'enzyme dans un état aussi pur que possible, nous avons surtout cherché les techniques d'élution qui nous permettent d'obtenir la meilleure activité spécifique et un pic de protéines homogène, même au détriment du rendement.

Les premières expériences ont consisté à adsorber la solution de protéines, provenant de la précipitation par le sulfate d'ammonium entre 60 et 80 % de la saturation, sur des colonnes de 3 gr de CM-cellulose équilibrée dans un tampon phosphate 0,01 M à pH 6,4. Avant la chromatographie, cette fraction protéique était dialysée contre du tampon phosphate pH 6,4 0,01 M jusqu'à élimination complète du sulfate d'ammonium. L'élution était réalisée par le passage successif des tampons phosphates à pH 6,4 0,01 M puis 0,05 M. L'enzyme était élué par une solution de sulfate d'ammonium 0,4 M dans le tampon phosphate 0,01 M. On a constaté, en effet, que le sulfate d'ammonium assure, pour l'élution, des rendements supérieurs à ceux qu'on obtient avec un tampon phosphate de même molarité.

Le premier pic de protéines, éluées avec le tampon 0,01 M, est constitué par des protéines anioniques non adsorbées. L'aspartique-décarboxylase est éluée par la solution de sulfate d'ammonium 0,4 M en même temps qu'une protéine colorée en rose le cytochrome c_3, identifié par son spectre différentiel. Le rendement sur la colonne était de 40 %. Pour séparer le cytochrome de l'aspartique-décarboxylase, nous avons essayé d'éluer ce dernier enzyme avec des concentrations de $SO_4(NH_4)_2$ inférieures à 0,4 M. La figure 40 nous montre que la décarboxylase est éluée avec une solution 0,12 M en $SO_4(NH_4)_2$ tandis que le cytochrome

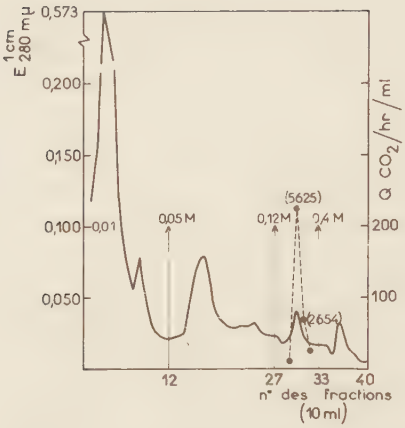


Figure 40.- Chromatographie de l'aspartique-décarboxylase sur CM-cellulose. Colonne (2 x 12 cm) de CM-cellulose équilibrée avec du tampon phosphate de sodium pH 6,4 0,01 M. Elution discontinue par les solutions suivantes : tampons phosphate de sodium pH 6,4 0,01 M ; 0,05 M ; et solutions de sulfate d'ammonium 0,12 M et 0,4 M dans le tampon phosphate 0,01 M. Charge : 47,8 mg de protéines. Rendement : 40 %. La courbe en traits pleins représente la densité optique à 280 mμ sous une épaisseur de 1 cm. La courbe en traits interrompus représente l'activité aspartique-décarboxylase (Q_{CO_2}/hr/ml). Les chiffres entre parenthèses indiquent l'activité spécifique (exprimée en Q_{CO_2}/hr/mg de protéines).

ne passe qu'avec une concentration en sel 0,4 M. L'activité spécifique s'élève jusqu'à 5 625 et le rendement est toujours de 40 %.

L'expérience qui vient d'être décrite, a été réalisée avec une solution de protéines 0,6 - 0,8 S dialysée contre du tampon acétate pH 5,0 0,002 M et non pas contre du tampon pH 6,4 comme précédemment. Cette dialyse précipite des protéines étrangères qui sont éliminées par centrifugation, ce qui multiplie l'activité spécifique par un facteur 3. Cette purification supplémentaire permet de diminuer la charge sur la colonne et d'éviter ainsi l'entraînement d'une partie de l'activité dans les premiers pics ce qui se produit lorsque la charge dépasse 200 mg.

D'autres techniques ont été essayées, en particulier l'absorption à pH plus acide (5,4 par exemple) et l'élution par des agents de pH plus élevé. Les rendements obtenus ainsi n'étant pas meilleurs, nous avons préféré chercher à améliorer la technique d'élution en employant un gradient discontinu de concentrations, ce qui est plus facile à réaliser.

Pour accroître les quantités d'enzyme purifié, nous avons essayé d'obtenir par une autre méthode d'extraction, des extraits bruts plus actifs. Le traitement des bactéries par les ultra-sons fournit des extraits bruts dont l'activité est supérieure à ceux des extraits obtenus par autolyse des bactéries séchées, mais ces préparations contiennent aussi une quantité plus importante de protéines totales soit environ 12 mg par ml. Les Q_{CO_2} par ml des extraits soniques sont sensiblement toujours les mêmes et de l'ordre de 1 000, tandis que les activités des extraits provenant de l'autolyse des bactéries séchées varient entre 200 et 600. Quant à l'activité spécifique par mg de protéine, elle est de 80 environ avec de faibles variations d'une préparation à l'autre.

Les étapes de la purification à partir des extraits soniques sont les mêmes que celles déjà décrites pour la chromatographie sur gel de brushite. Malheureusement, les rendements diminuent plus rapidement au cours des différents stades de la purification, parce que les précipités très abondants qui se forment avec la streptomycine ou par acidification entraînent souvent une grande partie de l'activité. Le fait qu'à ce stade de la purification une partie de l'enzyme accompagne les précipités lors de leur centrifugation n'est évidemment pas dû à ce que l'enzyme soit sous une forme particulaire. En effet, cette sédimentation se produit même à faible vitesse, alors qu'en l'absence de précipité de protéines étrangères, c'est-à-dire dans le cas des extraits bruts avant leur traitement par la streptomycine et l'acidification, l'enzyme reste dans le surnageant obtenu par centrifugation à 78 000 x g.

Le tableau XVIII montre les purifications et les rendements obtenus au cours des différents stades à partir d'extraits provenant du traitement sonique.

La chromatographie sur CM-cellulose est ensuite poursuivie comme précédemment mais avec quelques modifications en ce qui concerne les agents éluants. Nous avons remplacé les solutions de sulfate d'ammonium par des solutions de chlorure de sodium qui donnent le même rendement et présentent l'avantage de ne pas gêner le dosage des protéines par la méthode de Lowry. La fraction protéique 0,6 - 0,8 S dialysée est adsorbée sur de la CM-cellulose équilibrée par du tampon phosphate pH 6,4 0,01 M. L'élution est ensuite poursuivie par ce même tampon auquel on ajoute des concentrations croissantes de chlorure de sodium. Des solutions de concentration 0,03 M, 0,05 M, 0,08 M et 0,12 M sont employées successivement.

La solution 0,08 M élimine une quantité appréciable de protéines étrangères et l'emploi d'éluant à cette concentration permet d'obtenir un pic plus homogène de l'aspartique_décarboxylase qui est spécifiquement élué par la solution 0,12 M. La figure 41 montre une purification typique sur une colonne contenant 9 g de CM-cellulose. Cette technique fournit des préparations dont l'activité spécifique est de l'ordre de 11 000. De telles colonnes, cependant, sont trop lentes pour achever la purification en moins de 24 heures, durée maximum permise par l'instabilité de l'enzyme, et pour cette raison, nous avons préféré ramener les colonnes à 3 g de CM-cellulose.

Les résultats de cette technique chromatographique à laquelle nous nous sommes finalement arrêtés, sont représentés sur la figure 42 et le Tableau XIX.

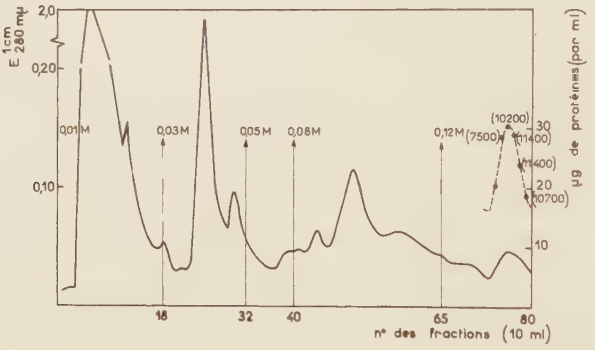


Figure 41.- Colonne 3 x 15 cm de CM-cellulose (9 g) équilibrée dans du tampon phosphate pH 6,4 0,01 M ; charge 96 mg de protéines. Elution discontinue par passage du tampon phosphate 0,01 M suivi par des solutions de concentration croissante de ClNa dans ce même tampon (vitesse d'écoulement 60 ml/heure). La courbe en traits pleins représente la densité optique à 280 mμ sous une épaisseur de 1 cm. La courbe en traits interrompus représente la quantité de protéines en μg par ml de fraction, dosée par la méthode de Lowry. Les chiffres entre parenthèses indiquent l'activité spécifique.

TABLEAU XVIII

Purification des extraits soniques. Rendement des stades préliminaires à la chromatographie.

	Q_{CO_2}/ml	Protéines mg/ml	Q_{CO_2}/mg	Rendements
Extrait brut	1 120	14,4	77,7	-
Stade I (Streptomycine)	816	9,074	89,8	56,5 %
Stade II (précipité acide)	744	5,39	135,8	53,5
Stade III (fraction 0,6-0,8 S)	1 830	4,0	457	22 %

TABLEAU XIX

Schéma d'une purification sur CM-cellulose

		* Protéines mg/ml	Q_{CO_2}/hr/ml	Q_{CO_2}/mg	Purification
Extrait brut		12,34	1020	82,5	
Extrait (Stade III)		4,0	2160	540	x 6,55
Fractions	38	0,005	92,7	16 850	x 205
	39	0,0123	339	27 600	x 336
	40	0,011	288	26 000	x 318
	41	0,004	105	25 400	x 310

* Protéines dosées par la méthode de Lowry

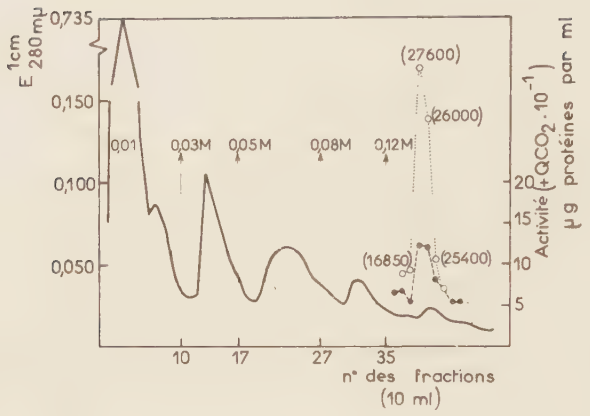


Figure 42.- Colonne 2 x 10 cm de CM-cellulose équilibrée dans du tampon phosphate pH 6,4 0,01 M ; charge : 40 mg de protéines (vitesse d'écoulement : 70 ml/hr.). Rendement 42 . Elution discontinue par le passage de la solution du tampon phosphate 0,01 M suivi par des solutions de concentration croissante de ClNa dans ce même tampon. La courbe en traits pleins représente la densité optique à 280 mμ sous une épaisseur de 1 cm. La courbe en traits interrompus représente la quantité de protéines en μg par ml d'éluat dosé par la méthode de Lowry. La courbe en pointillé représente l'activité exprimée en Q_{CO_2}/hr et /ml d'éluat. Les chiffres entre parenthèses indiquent l'activité spécifique (Q_{CO_2}/hr/mg de protéines).

On voit que l'activité spécifique des extraits purifiés atteint 27 000 environ, ce qui correspond à une purification de 330 fois. Le pic d'élution est sensiblement homogène et les faibles variations relevées entre les diverses fractions composant ce pic s'expliquent au moins en partie par le fait que la concentration en protéines est trop faible pour pouvoir être déterminée de façon extrêmement précise, même par la microméthode de Lowry. En fait, en partant de 4 900 mg de protéines dans l'extrait brut, nous n'avons pu obtenir plus de 0,3 mg de protéine dans l'ensemble des fractions actives.

Le rendement est de 42 % pour le dernier stade, c'est-à-dire la chromatographie, et de 10 % seulement par rapport à l'extrait brut initial. Ces résultats relativement peu favorables sont dus à ce qu'une partie de l'activité est entraînée par les précipités dans les premiers stades de la purification et, d'autre part, à la faible teneur de l'extrait brut en enzyme.

Shukuya et Schwert (113), purifiant sur DEAE-cellulose la glutamique-décarboxylase d'Escherichia coli, ont obtenu à partir de 2 350 mg de protéines 60 mg d'enzyme purifié. L'activité spécifique de ces préparations est d'environ 90 000, bien que la purification ne dépasse pas 10 fois. Le rendement est de 22 %, c'est-à-dire peu supérieur au nôtre. Ces faits indiquent que l'aspartique-décarboxylase de D. desulfuricans est un enzyme relativement peu actif par rapport à d'autres décarboxylases bactériennes et relativement peu abondant dans les cellules. De telles conditions sont évidemment défavorables pour la purification.

Il paraît difficile d'améliorer beaucoup la chromatographie sur CM-cellulose, par suite du fait qu'on ne peut augmenter la charge des colonnes sans s'exposer à ce que l'enzyme soit partiellement entraîné par des protéines étrangères.

Bien que nous n'ayons pu obtenir l'enzyme purifié qu'en quantités très faibles, ces dernières sont néanmoins suffisantes pour déterminer la teneur en PALP par les techniques de dosage biologique dont on a déjà souligné l'extrême sensibilité (0 à 25 mμg dans la prise d'essai).

IV. ACTION DES SELS SUR L'ACTIVITE DE L'ENZYME PURIFIE.

Comme les extraits traités par le sulfate d'ammonium, les préparations purifiées par chromatographie sont activées par les céto-acides ou par le PALP (tableau XX).

Afin de déterminer si les sels minéraux contenus dans les préparations purifiées ont un effet sur l'activité de l'enzyme, on a procédé à une filtration sur colonne de Séphadex G 25 (Cf Chapitre II). L'aspartique-décarboxylase passe sur ce gel immédiatement après le volume mort sans aucune perte de l'activité totale. D'autre part, on constate (Tableau XX) que les préparations filtrées ne sont plus réactivées par le pyruvate ni par le PALP. Il semble donc que les fortes concentrations

TABLEAU XX

Action du pyruvate et du PALP sur l'activité aspartique-décarboxylase des préparations purifiées par chromatographie.

Additions	Activité	
	Avant filtration sur Sephadex	Après filtration sur Sephadex
Néant	100	100
Pyruvate 10^{-3}M	177	116
PALP 10^{-3} M	130	111
Pyruvate + PALP	163	107

en sels inhibent partiellement et reversiblement l'enzyme purifié.

On a déjà vu que l'action des céto-acides sur l'activité enzymatique est vraisemblablement dûe à la transformation du PAMP en PALP. D'après Braunstein (20), la forme inactive du coenzyme, c'est-à-dire le PAMP, pourrait être formée par hydrolyse des complexes cétimines (Fig. 8) qui sont formés au cours de la β-décarboxylation. Dans le cadre de ces interprétations, l'effet inhibiteur des sels pourrait s'expliquer en supposant qu'ils facilitent l'hydrolyse de la cétimine, et convertissent ainsi le coenzyme en PAMP.

V. DOSAGE DU PYRIDOXAL-PHOSPHATE DANS LES FRACTIONS PURIFIEES.

Les fractions chromatographiques ayant des activités spécifiques voisines ont été réunies et concentrées . Comme l'aspartique-décarboxylase n'est pas stable en solution diluée, il est nécessaire d'opérer

cette concentration immédiatement après le passage sur la colonne.

La plupart des procédés de concentration que nous avons essayés, et en particulier la lyophilisation, inactivent l'aspartique-décarboxylase. Des résultats inconstants ont été obtenus par perévaporation et par dialyse contre du subtosan (polyvinyle-pyrrolidone). Cette dernière technique a en outre l'inconvénient de contaminer les préparations par des substances absorbant dans l'ultra-violet. En définitive, le procédé le plus satisfaisant consiste dans une simple évaporation sous vide pendant 12 heures en présence de Cl_2Ca. Il est indispensable d'éviter une dessication complète, et, à cette condition, une concentration au dixième du volume initial n'entraîne qu'une perte d'activité de 10 % seulement.

Un volume exactement mesuré de solution concentrée est alcalinisé par addition de NaOH jusqu'à concentration finale 0,1 M, puis porté à 100° pendant 5 min. dans un bain marie bouillant, pour libérer le coenzyme. Après refroidissement, la solution est neutralisée par addition de SO_4H_2 et des aliquots sont prélevés pour doser le PALP par la technique de Gunsalus et Smith (48) dans les conditions déjà décrites (Chapitre II). Dans toutes les expériences qui ont été réalisées, on a constaté que les fractions purifiées réactivent la tyrosine apo-décarboxylase de Streptococcus faecalis, et que cette réactivation est toujours beaucoup plus grande lorsque les préparations dosées ont été préalablement chauffées en présence de soude. Ces observations démontrent que l'aspartique-décarboxylase purifiée contient du PALP, et que ce coenzyme est fortement uni à l'apo-protéine par une liaison qui n'est rompue que par l'hydrolyse alcaline.

Les dosages du PALP n'ont pas donné des résultats absolument constants. Cependant, les valeurs les plus souvent relevées sont de l'ordre de 330 mμg par mg de protéine purifiée. Un exemple typique de déterminations est rapporté sur le tableau XXI.

On voit qu'au cours des premiers stades de la purification la teneur en PALP par mg d'azote protéique s'abaisse, ce qui correspond au fait que la précipitation par le sulfate d'ammonium (chap. III) élimine d'autres enzymes à PALP, dont notamment la glutamique-décarboxylase, et peut-être aussi une certaine quantité de coenzyme libre, qui reste dans le surnageant. Après la purification finale par chromatographie sur colonne, on constate un très fort enrichissement en PALP lié. En prenant comme

TABLEAU XXI

Dosage du phosphate de pyridoxal dans les extraits enzymatiques

	Activité spécifique	Teneur en PALP mμg/mg de protéines	
		Extrait non bouilli	Extrait bouilli
Extrait brut	54	4,8	34,3
Extrait III	24,2	2,6	4,5
Extrait III + pyruvate 10^{-3} M	200,0	2,5	10,6
Fractions purifiées + pyruvate 10^{-3} M	15 300	4,8	336,0

base d'estimation la teneur moyenne de 330 mμg de PALP par mg de protéine, et en supposant que l'enzyme contient une seule molécule de coenzyme par molécule, le poids moléculaire de l'aspartique-décarboxylase serait de l'ordre de 800 000. Cette valeur semble anormalement élevée. En effet, dans le cas de la glutamique-décarboxylase d'E. coli, Shukuya et Schwert (113) ont trouvé que deux molécules de PALP sont fixées sur la molécule d'apoprotéine, et que le poids moléculaire de cette dernière ne dépasse pas 300 000. Il est vraisemblable que, dans notre cas, l'hydrolyse alcaline ne libère pas la totalité du PALP lié. Pour s'en assurer et pour déterminer de façon précise la teneur réelle en PALP, il faudrait disposer de quantités d'enzyme purifié suffisantes pour procéder à des dosages spectrophotométriques.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord établi que la souche El Agheila Z se distingue des autres souches de Desulfovibrio desulfuricans par la propriété de décarboxyler les acides L-glutamique et L-aspartique. Les études préliminaires effectuées avec des extraits bruts non purifiés (chapitre III) ont montré que le pH et la concentration en substrat influent de façon différente sur les deux activités décarboxylases, ce qui suggère que ces réactions sont catalysées par deux enzymes distincts. Dans le cas de l'acide aspartique, la décarboxylation porte sur la fonction β-carboxylique, avec formation de L-α-alanine ; d'autre part, l'addition de pyridoxal-phosphate (PALP) ou de céto-acides, accroît l'activité des extraits et la restaure lorsque les préparations ont été inactivées par dialyse, par irradiation dans l'ultra-violet, par les réactifs du groupement carbonyle, tels que l'hydroxylamine et la semi-carbazide, ou enfin par l'hydrazide de l'acide iso-nicotinique, qui est considérée comme un inhibiteur spécifique des enzymes à vitamine B_6.

Ces particularités nous ont conduits à entreprendre une étude plus approfondie, dans le but de déterminer si la transformation de l'acide L-aspartique en α-alanine est effectuée par une décarboxylase spécifique, et dans l'affirmative, si le phosphate de pyridoxal est, comme on peut s'y attendre, le cofacteur de cet enzyme.

L'effet remarquable des céto-acides sur l'activité aspartique-décarboxylase pose, en effet, le problème suivant : la formation de l'α-alanine correspond-elle à une décarboxylation directe de l'acide aspartique, ou bien résulte-t-elle d'une série complexe de transaminations intermédiaires ? Cette dernière hypothèse, également envisagée par Meister, qui avait déjà observé la conversion de l'acide aspartique en α-alanine par une autre bactérie anaérobie stricte, Clostridium welchii, ne pouvait être éliminée de façon formelle du fait que les extraits bruts obtenus par Meister et par nous-mêmes contiennent diverses transaminases et, en particulier, une transaminase aspartique-glutamique relativement très active.

Pour ces raisons, nous nous sommes efforcés d'isoler et de purifier le système enzymatique responsable de la formation de l'α-alanine (chapitre IV). Après élimination des acides nucléiques par le sulfate de streptomycine et précipitation de protéines inactives par acidification à pH 5,0, on a appliqué la méthode conventionnelle de précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium. La glutamique-décarboxylase précipite entièrement à 0,6 S, tandis qu'entre 0,6 et 0,8 S précipitent la quasi totalité de l'aspartique-décarboxylase et de la transaminase.

La fraction contenant ces derniers enzymes a été purifiée par chromatographie sur gel de brushite avec gradient discontinu de concentration. On a séparé ainsi la transaminase aspartique-glutamique, entièrement éluée par le tampon phosphate 0,1 M, et l'aspartique-décarboxylase, éluée par le tampon 0,2 M, dans le troisième pic chromatographique. Ce résultat permet d'éliminer définitivement l'hypothèse des transaminations intermédiaires.

Par chromatographie sur gel de brushite, on obtient une purification d'environ 150 fois et des préparations dont l'activité spécifique est de l'ordre de 10 000. Mais le pic des protéines actives n'est cependant pas homogène, ce qui indique que la purification est incomplète. D'autre part, nous avons constaté que les préparations purifiées sont en général peu actives, et qu'elles sont réactivées par les céto-acides ou par le phosphate de pyridoxal.

On aurait pu penser a priori que l'inactivation de l'aspartique-décarboxylase au cours de sa purification soit dûe à une résolution de l'apoenzyme et du cofacteur, comme cela se produit d'ailleurs dans le cas d'autres enzymes à PALP. Cette éventualité doit cependant être éliminée. En effet, les préparations sont réactivées non seulement par le coenzyme lui-même, mais encore par les céto-acides, et par une simple dialyse prolongée des préparations traitées par le sulfate d'ammonium suffit même pour restituer presque complètement leur activité. On doit donc considérer qu'au cours de la purification, le coenzyme demeure fixé sur l'apoprotéine, mais est converti en une forme inactive. Dans le cadre de cette interprétation, l'activation de l'aspartique-décarboxylase par le PALP paraît relever du même mécanisme, c'est-à-dire qu'elle serait liée à un effet non spécifique de la fonction aldéhydique de ce composé. et non pas à ses propriétés coenzymatiques. Cette conclusion concorde,

d'ailleurs, avec le fait que la forme non phosphorylée du pyridoxal (PAL) exerce, elle aussi, un effet réactivant.

L'inactivation reversible de l'enzyme se produit dès les premiers stades de la purification, au cours du relargage par le sulfate d'ammonium. On a établi que les préparations débarrassées du sulfate d'ammonium par dialyse et réactivées par les céto-acides, sont à nouveau réversiblement inhibées par l'addition de $SO_4(NH_4)_2$. D'autre part, on a observé que l'action du sulfate d'ammonium n'est pas dûe au cation NH_4^+, mais à l'anion, c'est-à-dire $SO_4^=$. Parmi les autres anions essayés, NO_3^- exerce un effet inhibiteur analogue à celui du sulfate, tandis que Cl^- est inactif.

Il est vraisemblable que la forme inactive du coenzyme soit le phosphate de pyridoxamine (PAMP) et que celui-ci se produise, comme il a été dit au chapitre VI, par hydrolyse de complexes cétimines en présence de concentrations élevées en ions $SO_4^=$ ou NO_3^-. La réactivation de l'enzyme s'explique, d'autre part, par une transamination non enzymatique du PAMP en PALP. Nous avons constaté (chapitre V) que de telles transaminations s'effectuent dans les conditions physiologiques (+ 37° C), au pH optimum de l'activité aspartique-décarboxylase (pH 5,0), et qu'elles sont catalysées par de très faibles concentrations en ions métalliques. L'étude cinétique de ces réactions montre que les pH acides favorisent la décomposition des bases de Schiff formées en présence d'ions Cu^{++} et que les transaminations non enzymatiques qui en résultent, s'opèrent plus rapidement et plus complètement dans le sens PAMP $\longrightarrow$ PALP, qu'en sens inverse.

Récemment Wada et Snell (128) ont isolé et purifié des transaminases bactériennes PAM-oxalacétate et PAM-pyruvate. Mais ces enzymes ne sont actifs qu'en milieu alcalin et leur pH optimum est voisin de 9,0. Si de telles transaminases existent pour les dérivés phosphorylés de la vitamine B_6, il est peu probable qu'elles agissent aux pH acides où nous avons constaté l'activation de l'aspartique-décarboxylase par les céto-acides et où cette décarboxylase est elle-même active. A ce sujet, Bellamy, Umbreit et Gunsalus (11) ont signalé que les suspensions non proliférantes de Streptococcus faecalis incubées en présence de PAMP et de pyruvate ne forment du PALP qu'à pH 7,0, et pas à pH 5,0. En définitive, le mécanisme le plus plausible pour expliquer la réactivation de l'aspartique-décarboxylase par les céto-acides paraît être celui d'une conversion du PAMP en PALP par transamination non enzymatique.

La purification par passage sur colonne de carboxy-méthyl cellulose (chapitre VI) a conduit à plusieurs résultats intéressants. On a obtenu ainsi des préparations douées d'une très grande activité spécifique (25 à 27 000), ce qui correspond à une purification d'environ 330 fois par rapport aux extraits bruts initiaux. Bien que les quantités finales d'enzyme purifié soient trop faibles pour que les teneurs en protéines puissent être déterminées avec une grande précision par les moyens analytiques disponibles, les différentes fractions composant le pic d'élution de l'aspartique-décarboxylase, paraissent être homogènes. Enfin, le dosage biologique du PALP sur les préparations purifiées démontre que l'aspartique-décarboxylase est un enzyme à phosphate de pyridoxal, et que ce cofacteur est fortement fixé sur l'apoprotéine spécifique.

Il est regrettable que la teneur de l'aspartique-décarboxylase dans les cellules de l'organisme étudié soit faible, et, semble-t-il, très inférieure à celles d'autres enzymes à PALP chez certaines expèces bactériennes (113). A cause de ce fait, il n'a pas été possible de préparer l'enzyme purifié en quantités suffisantes pour l'obtenir sous forme cristallisée, ni pour lui appliquer les tests usuels de pureté et les méthodes physiques de détermination des poids moléculaires. Il aurait été également nécessaire d'obtenir l'enzyme purifié en quantités plus élevées pour relever son spectre, et pour étudier le mode de liaison entre le coenzyme et l'apoprotéine.

Nous espérons que des recherches ultérieures nous permettront de répondre à ces questions encore en suspens.

BIBLIOGRAPHIE

1 Ackermann, D., Z. physiol. Chem. 56, 305 (1908) ; 65, 278 (1910).

2 Ames, S.R., Sarma, P.S. and Elvehjem, J. Biol. Chem. 167, 135 (1947).

3 Aqvist, S.F.G. and Anfinsen, C.B., J. Biol. Chem. 234, 1112 (1959).

4 Baddiley, J. and Gale, E.F., Nature, 155, 727 (1945).

5 Baddiley, J. and Mathias, A.P., J. Chem. Soc. p. 2583 (1952).

6 Baddiley, J., Nature, 170, 711 (1952).

7 Baranowski, T., Illingworth, B., Brown, D.H. and Cori, C.F., Biochim. Biophys. Acta 25, 16 (1957).

8 Barger, W. and Walpole, G.S., J. physiol (London) 38, 343 (1909).

9 Beechey, R.B. and Happold, F.C., Biochem. J. 61, xx (1955) ; 66, 520 (1957).

10 Bellamy, W.D. and Gunsalus, I.C., J. Bact., 48, 191 (1944).

11 Bellamy, W.D., Umbreit, W.W. and Gunsalus, I.C., J. Biol. Chem. 160, 461 (1945).

12 Bheemeswar, B., Nature, 17, 555 (1955).

13 Biehl, J.P. and Vilter, R.W., Proc. Soc. Expth. Biol. Med., 85, 389 (1954).

14 Blakley, R.L., Biochem. J., 61, 315 (1955).

15 Blaschko, H., Biochem. J., 36, 571 (1942).

16 Blaschko, H., Biochim. Biophys. Acta 4,130 (1950).

17 Braunstein, A.E. and Shemyakin, M.M., Biokhimiya, 18, 393 (1953).

18 Braunstein, A.E. and Yu, V., Bukin Doklady Akad. Nank S.S.S.R., 106, 95 (1956).

19 Braunstein, A.E., Advances in Enzymol., 19, 356 (1957).

20 Braunstein, A.E., The Enzymes, vol III, 113 (1960).

20 a Cattanéo-Lacombe, J. et Senez, J.C., C. R. Soc. Biol. Tome CL, n°4, 748 (1956).

20 b Cattanéo-Lacombe, J., Senez, J.C. et Beaumont, P., Biochim. Biophys. Acta 30, 458 (1958).

20 c Cattanéo, J., Senez, J.C. et Beaumont, P., Biochim. Biophys. Acta 44, 543 (1960).

21 Christensen, H.N. and Collins, S., J. Biol. Chem., 220, 279 (1956).

22 Christensen, H.N., J. Am. Chem. Soc., 79, 4073 (1957).

23 Christensen, H.N., J. Am. Chem. Soc., 80, 99 (1958).

24 Clark, C.T., Weissback, H. and Udenfriend, S., J. Biol. Chem, 210, 139 (1954).

25 Cohen, P.P. and Lichstein, H.C., J. Biol. Chem., 159, 367 (1945).

26 Crawford, L.V., Biochem. J., 68, 221 (1958).

27 Davison, A.N., Biochim. Biophys. Acta, 19, 131 (1956).

28 Denman, R.F., Hoare, D.S. and Work, E., Biochim. Biophys. Acta, 16, 442 (1955).

29 Dewey, D.L. and Work, E., Nature, 169, 533 (1952).

30 Dewey, D.L., Hoare, D.S. and Work, E., Biochem. J., 58, 523 (1954).

31 Eichorn, G.L. and Dawes, J.W., J. Am. Chem. Soc., 76, 5663 (1954).

32 Ekladius, L., King, H.K. and Sutton, C.R., J. Gen. Microbiol., 17, 602 (1957).

33 Ellinger, A., Ber., 31, 3183 (1898).

34 Ellinger, A., Z. physiol. Chem., 29, 334 (1900).

35 Epps, H.M.R., Biochem. J., 38, 242 (1944).

36 Epps, H.M.R., Biochem. J., 47, 605 (1944).

37 Fasella, P., Lis, H., Siliprandi, N. and Baglioni, C., Biochim. Biophys. Acta, 23, 417 (1957).

38 Gale, E.F., Biochem. J., 34, 392 (1940).

39 Gale, E.F., Biochem. J., 34, 846 (1940).

40 Gale, E.F., Biochem. J., 34, 853 (1940).

41 Gale, E.F., Biochem. J., 35, 66 (1941).

42 Gale, E.F. and Epps, H.M.R., Biochem. J., 38, 250 (1944).

43 Gale, E.F. and Epps, H.M.R., Biochem. J., 38, 232 (1944).

44 Gale, E.F., Advances in Enzymol. 6, 1 (1946).

45 Guirard, B.M. and Snell, E.E., J. Am. Chem. Soc. 76, 4745 (1954).

46 Gunsalus, I.C. and Bellamy, W.D., J. Biol. Chem. 155, 357 (1944).

47 Gunsalus, I.C., Bellamy, W.D. and Umbreit, W.W., J. Biol. Chem. 155, 685 (1944).

48 Gunsalus, I.C. and Smith, R.A., in "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Eds) vol III, 963 Academic Press, New York (1957).

49 Gunsalus, C.F. and J. Tonzetich, Nature, 170, 162 (1952).

50 Hanke, M.T. and Koessler, K.K., J. Biol. Chem. 39, 539 (1919).

51 Hanke, M.T. and Koessler, K.K., J. Biol. Chem. 50, 131 (1922).

52 Hanke, M.T. and Koessler, K.K., J. Biol. Chem. 59, 835 (1924).

53 Hanke, M.T. and Koessler, K.K., J. Biol. Chem. 59, 855 (1924).

54 Hanke, M.T. and Loessler, K.K., J. Biol. Chem. 59, 867 (1924).

55 Harris, S.A., Webb, T.J. and Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 62, 3198 (1940).

56 Hartmann, W.J., Pogrund, R.S., Drell, W. and Clark, W.G., JACS, 77 816 (1955).

57 Heyl, D., Luz, E., Harris, S.A. and Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 70, 3429, 3669 (1948).

58 Heyl, D., Luz, E., Harris, S.A. and Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 73, 3430 (1951).

59 Heyl, D., Luz, E., Harris, S.A. and Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 74, 414 (1952).

60 Hoare, D.S. and Work, E., 3rd Intern. Congr. Biochem. Brussels p. 4 à 65 (1955).

61 Holtz, P., Credner, K. and Walter, H., Z. physiol. Chem., 262, 111 (1939).

62 Hope, D.B., Biochem. J., 59, 497 (1955).

63 Hurwitz, J., Biochim. Biophys. Acta, 9, 496 (1952).

64 Hurwitz, J., J.Biol. Chem., 205, 935 (1953).

65 Ikawa, M. and Snell, E.E., J. Am. Chem. Soc., 76, 653 (1954).

66 Jenkins, W.T., Yphantis, D.A. and Sizer, I.W., J. Biol. Chem, 234, 51 (1959).

67 Jenkins, W.T., Orlowki, S. and Sizer, I.W., J. Biol. Chem., 234, 2657 (1959).

68 Jenkins, W.T., and Sizer, I.W., J. Am. Chem. Soc. 79, 2655 (1957).

69 Jenkins, W.T., and Sizer, I.W., J. Biol. Chem., 234, 1179 (1959).

70 King, H.K., Biochem. J., 54, XI (1953).

71 Lichstein, H.C., Proc. Soc. Expth. Biol. Med., 88, 519 (1955).

72 Linstedt, S., Acta Chem. Scand. 5, 486 (1951).

73 Longenecker, J.B. and Snell, E.E., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 42, 221 (1956).

74 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

75 Mandeles, S., Koppelman, R. and Hanke, M.E., J. Biol. Chem. 209, 327 (1954).

76 Marchis-Mouren, Constantin, M.J. et Desnuelle, P., Bull. Soc. Chim. Soc. 40, 2019 (1958).

77 Mardashev, S.R. and Etingol, R.N., Biokhimiya 13, 402 (1948)
N. Kulakovskaya, N., Dissertation, Moscow (1956).

78 Martell, A.E. and Calvin, M., "Chemistry of the Metalchelate Compounds" 1953 Prentice Hall, New York.

79 Matsuo, Y., J. Am. Chem. Soc., 79, 2011 (1957).

80 Matsuo, Y., J. Am. Chem. Soc., 79, 2016 (1957).

81 Matsuo, Y. and Greenberg, D.M., Federation Proc. 16, 218 (1957).

82 Matsuo, Y. and Greenberg, D.M., J. Biol. Chem. 230, 561 (1958).

83 Matsuo, Y. and Greenberg, D.M., J. Biol. Chem. 234, 507, 516 (1959).

84 McCullough, W.G., Piligian, J.T. and Daniel, I.J., J. Am. Chem. Soc. 79, 628 (1957).

85 McGilvery, R.W. and Cohen, P.P., J. Biol. Chem., 174, 813 (1948).

86 Meister, A., "Biochemistry of the amino-acids" Academic Press, New York (1957).

87 Meister, A., Sober, H.A. and Tice, S.V., J. Biol. Chem., 189, 577 (1951).

88 Meister, A., Sober, H.A. and Peterson, E.A., J. Am. Chem. Soc. 74, 2385 (1952).

89 Meister, A., Sober, H.A. and Peterson, E.A., J. Biol. Chem., 206 89 (1954).

90 Meister, A. and Downey, P.F., Proc. Soc. Expth. Biol. Med. 91, 49 (1958).

91 Metzler, D.E. and Snell, E.E., J. Am. Chem. Soc. 74, 979 (1952).

92 Metzler, D.E. and Snell, E.E., J. Am. Chem. Soc. 77, 2431 (1955).

93 Metzler, D.E., J. Am. Chem. Soc. 79, 485 (1957).

94 Metzler, D.E., Longenecher, J.B. and Snell, E.E., J. Am. Chem. Soc. 76, 639 (1954).

95 Metzler, D.E., Ikawa, M., and Snelle, E.E., J. Am. Chem. Soc. 76, 648 (1954).

96 Patwardhan, M.V., Nature, 181, 187 (1958).

97 Peterson, E.A. and Sober, H.A., J. Am. Chem. Soc. 78, 751 (1956).

98 Pogell, B.M., Abstracts, Fall Meeting, American Chemical Society, New York p. 85 C (1957).

98 bis Porath J. and Flodin, P., Nature, 183, 1657, (1959).

99 Postgate, J.R., J. Gen. Microbiol. 14, 545 (1956).

100 Rabinowitz, J.C. and Snell, E.E., Anal. Chem. 19, 277 (1947).

101 Rabinowitz, J.C. and Snell, E.E., J. Biol. Chem. 169, 643 (1947).

102 Rhodes, M.B., Azari, P.B. et Feeney, R.E., J. Biol. Chem. 230, 399 (1958).

103 Roberts, E. and Frankel, S., J. Biol. Chem. 188, 789 (I95I)

104 Roberts, E. and Frankel, S., J. Biol. Chem. 190, 505 (1951)

105 Schales, O. and Schales, S.S., Arch. Biochem. 11, 155 (1946)

106 Schales, O., Mimms, V. and Schales, S.S., Arch. Biochem. 10, 455 (1946)

107 Schlenk, F., Fisher, A. and Snell, E.E., Proc. Soc. Exp. Biol and Med, 61, 183 (1946).

108 Schwartz, R. and Kjeldgaard, N.O., Biochem. J. 48, 338 (1951).

109 Senez, J.C., Ann. Inst. Pasteur 83, 786 (1952).

110 Senez, J.C. and Leroux-Gilleron, J., J. Bull. Soc. Chim. Biol., 56, 553 (1954).

111 Senez, J.C. et Pichinoty, F., Biochim. Biophys. Acta, 28, 355 (1958).

112 Senez, J.C. et Cattanéo-Lacombe, J., C.R.Ac.Sc., 242, 943 (1956).

113 Shukuya, R. and Schwert, G.W., J. Biol. Chem. 235, 1649 (1960).

114 Snell, E.E., J. Biol. Chem. 154, 313 (1944).

115 Snell, E.E., Guirard, B.M. and Williams, R.J., J. Biol. Chem. 143, 519 (1942).

116 Snell, E.E., Physiol. Revs, 33, 509 (1953).

117 Snell, E.E., Vitamins and Hormones, 16, 77 (1958).

118 Sober, H.A. et Peterson, E.A., Fed. Proceed. 17, 1116 (1958).

119 Summer, J.B., Science, vol 100 n° 2601 (1944).

120 Taborsky, G., J. Biol. Chem. 234, 2652 (1959).

121 Taylor, E.S. and Gale, E.F., Biochem. J. 39, 52 (1945).

122 Tiselius, A., Hjerten, S., Levin, O., Arch. Biochem. Biophys. 65, 132 (1956).

123 Udenfriend, S., Clark, C.T. and Titus, E., J. Am. Chem. Soc. 75, 501 (1953).

124 Umbreit, W.W., Kane, D.J.O. and Gunsalus, I.C., J. Bact. 51, 576 (1916). P. Karrer, M. Viscontini and O Foster, ibid.

125 Umbreit, W.W., Burris, R.H. and Stauffer, J.F., Manometric techniques and tissue metabolism, Burgess Publishing C°, Minneapolis (1949).

126 Virtanen, A.I. and Laine, T., Enzymologia, 3, 266 (1937).

127 Virtanen, A.I., Rintola, P. and Laine, T., Nature, 142, 674 (1938).

128 Wada, H. and Snell, E.E., J. Biol. Chem. 237, 127 (1962).

129 Wada, H. and Snell, E.E., J. Biol. Chem. 237, 133 (1962).

130 Warburg et Christian, Methods in Enzymology vol III, 73, 453 (1957).

131 Werle, E. and Koch, W., Biochem. Z. 319, 305 (1949).

132 Werle, E., Biochem. Z. 288, 292 (1936).

133 Wiegand, R.B., J. Am. Chem. Soc. 78, 5307 (1956).

134 Wingo, W.J. and Awapara, J., J. Biol. Chem. 187, 267 (1950).

135 Witkop, B. and Beyler, T.W., J. Am. Chem. Soc. 76, 5589 (1954).

136 Yoneda, M., Kato, N. and Okajuna, M., Nature, 170, 803 (1952).

137 Yoneda, M. and Asano, N. Science, 117, 277 (1953).

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 10

CHAPITRE I

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction 12

I. Décarboxylases des mammifères et des végétaux 13

II. Décarboxylases bactériennes 13

a) Nature des acides aminés décarboxylés

b) Condition de formation des amino-acides décarboxylases bactériennes 15

1. Présence du substrat

2. pH du milieu de culture 16

3. Température

4. Age des cellules 17

c) Conditions d'activité

1. Spécificité du substrat

2. pH optimum d'activité 18

III. Structure moléculaire des décarboxylases

a) Nature du coenzyme

b) Formation de l'apoenzyme en l'absence de coenzyme ... 20

c) Résolution apoenzyme-coenzyme

IV. Mode d'action des enzymes à pyridoxal-phosphate 21

a) Etude des propriétés chimiques du pyridoxal et de son phosphate en relation avec leurs activités catalytiques.

Pages

1. Formes d'équilibre de la vitamine B_6 en solution aqueuse 21
2. Formation d'imines entre le pyridoxal ou son phosphate et les amino-acides ou les amines .. 22
3. Réaction du pyridoxal et de ses imines avec les ions métalliques. Formation de complexes . 24

b) Mécanisme général des réactions catalysées par les enzymes à pyridoxal-phosphate 25

c) Influence des ions métalliques sur les enzymes à pyridoxal-phosphate 30

V. Métabolisme des pyridoxines

CHAPITRE II

METHODES EXPERIMENTALES

I. Préparation des extraits bruts 33

II. Tests d'activité

a) Méthode manométrique de Warburg 34

b) Méthode qualitative pour localiser la β aspartique-décarboxylase et la transaminase aspartique-glutamique dans les fractions chromatographiques au cours de la purification 34

III. Dosage des protéines 35

IV. Techniques de purification 36

a) Chromatographie par adsorption sur gel de brushite

b) Chromatographie d'échange d'ions sur les dérivés de la cellulose

V. Dosage du pyridoxal-phosphate 36

VI. Dosage des phosphates 38

VII. Dessalage des fractions purifiées et concentrées

CHAPITRE III

Pages

PROPRIETES DES AMINO-ACIDES DECARBOXYLASES PRESENTES DANS LES EXTRAITS BRUTS

1) Spécificité 41
2) Activité aspartique-décarboxylase en fonction de la quantité d'enzyme 43
3) Constantes d'affinité
4) Action des acides α cétoniques 44
5) Action du pyridoxal-phosphate 45
6) Activité en fonction du pH. Influence des tampons 47
7) Influence de la température 49
8) Action des inhibiteurs 50

CHAPITRE IV

PURIFICATION SUR GEL DE BRUSHITE. SEPARATION DES ENZYMES

I. Purification de l'aspartique-décarboxylase 57
Stade I. Précipitation des nucléoprotéines par le sulfate de Streptomycine
Stade II. Précipitation acide 58
Stade III. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium
Stade IV. Chromatographie d'adsorption sur gel de brushite .. 59
II. Etude de l'activité aspartique-décarboxylase dans les extraits partiellement purifiés (Stade III) 63
Forme du coenzyme dans les préparations traitées par le sulfate d'ammonium 69

CHAPITRE V

CONVERSION REVERSIBLE, PAR TRANSAMINATION NON ENZYMATIQUE, DU PYRIDOXAMINE-PHOSPHATE (PAMP) EN PYRIDOXAL-PHOSPHATE (PALP).

Pages

I. Transamination en présence d'extrait enzymatique 71
II. Transaminations chimiques du phosphate de pyridoxamine et du phosphate de pyridoxal 72
A) Methodes expérimentales
1. Systèmes
2. Méthodes spectrophotométriques
3. Chromatographie sur papier 73
B) Etudes cinétiques
1. Réactions entre PALP et amino-acides en l'absence de métaux
2. Systèmes PALP-amino-acides-cuivre 74
3. Réactions entre PAMP et céto-acides en présence de cuivre 80
III. Discussion 81

CHAPITRE VI

CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS D'IONS DE LA 4-ASPARTIQUE-DECARBOXYLASE

I. Introduction 86
II. Essais préliminaires d'adsorption de la décarboxylase sur DEAE et sur CM-cellulose en fonction du pH 87
III. Essais de purification de l'aspartique-décarboxylase sur CM-cellulose 89
IV. Action des sels sur l'activité de l'enzyme purifié 95
V. Dosage du pyridoxal-phosphate dans les fractions purifiées 96

CONCLUSIONS 99

BIBLIOGRAPHIE 103

IMP. LOUIS-JEAN – GAP

Dépôt légal n° 213 – 1962